

Universidade Federal do Paraná

Instituto Carlos Chagas

Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS QUE INTERAGEM COM A
UBIQUITILAÇÃO EM *TRYPANOSOMA CRUZI***

por

Carla Vanessa de Paula Lima

CURITIBA
Maio, 2009

CARLA VANESSA DE PAULA LIMA

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS QUE INTERAGEM COM A
UBIQUITILAÇÃO EM *TRYPANOSOMA CRUZI***

Dissertação apresentada à
coordenação do curso de Biologia
Celular e Molecular da
Universidade Federal do Paraná,
para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio
Krieger.

Curitiba 2009

Dedico aos meus amados pais, Marco e Alcione.

“Acredito em fatos, não em intenções.
Acredito em atitudes, não em discursos.
Acredito em posturas éticas, não em regras de moral.
Acredito em fazer acontecer, não em esperar que aconteça.
Acredito em criatividade, não em obstáculo.
O que importa são as tentativas e não os acertos. [...]

O prazer de continuar buscando é infinitamente maior que o sucesso de alcançar. Toda transformação começa caótica e desconfortável. Os caminhos conhecidos são seguros e fáceis, mas só conduzem a lugares onde já estamos e não desejamos ficar. O caminho do novo é cheio de riscos, surpresas e cansaço mas sempre premia os que o escolhem com a chance de descobrirem e experimentarem a vida que imagina viver."

Geraldo Eustáquio de Souza

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Dr. Marco Aurélio Krieger pela confiança creditada, orientação e apoio.

Ao Mestre Fabrício Klerynton Marchini pela coorientação “não oficial”, apoio, discussões e sugestões aos meus experimentos

À Prof. Dra. Vanessa Santos Sotomaior, pois foi quem despertou em mim o interesse pela pesquisa científica.

À Mestre Josiane Cardoso, pela amizade, companheirismo e toda ajuda e conselhos oferecidos no decorrer deste projeto.

Ao Dr. Stênio Perdigão Fragoso, pela confiança, ajudas e sugestões no decorrer de todo o trabalho.

Ao Dr. Samuel Goldenberg, diretor do ICC, pela oportunidade de desenvolver minha dissertação no Instituto.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Aos amigos do Instituto Carlos Chagas que colaboraram direta ou indiretamente com este projeto.

Aos meus amigos que, presentes ou não, sempre torceram pelo meu sucesso.

Ao Gui pela paciência, amor e apoio emocional.

À minha amada família que sempre acreditou em mim, dedicando tempo, carinho e compreensão em todos os momentos da minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> e a Doença de Chagas.....	1
1.2 Ciclo de Vida do <i>T. cruzi</i>	2
1.3 Genoma e expressão gênica em <i>T. cruzi</i>	4
1.4 Proteínas modificadoras	7
1.4.1 Ubiquitina	7
1.4.2 Proteínas semelhantes à ubiquitina (Ub-like).....	8
1.5 Processo de modificação / ubiquitilação	10
1.6 Componentes da via de ubiquitilação / modificação	13
1.6.1 Enzima ativadora de Ub (E1)	13
1.6.2 Enzima conjugadora/carreadora de Ub (E2)	14
1.6.3 Enzima ligadora de Ub / Ub ligase (E3)	15
1.6.4 Enzima de-ubiquitinadora (DUB).....	16
1.6.5 Fatores de extensão de cadeia (E4)	18
1.7 Proteassomo.....	19
1.7.1 Sistema proteassomo-Ub (UPS)	20
1.8 Domínios de ligação de ubiquitina	21
1.9 Ubiquitilação em tripanossomatídeos	23
2. OBJETIVOS	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Materiais e Procedência	27
3.2 Meios de Cultura.....	31
3.3 Soluções e Tampões	31
3.4 Organismos	34
3.5 Vetores plasmidiais.....	35
3.5.1 Para clonagem e expressão em <i>E. coli</i>	35
3.5.2 Para expressão em <i>T. cruzi</i>	36

3.6 Extração de DNA genômico de <i>T. cruzi</i>	38
3.7 Eletroforese de DNA.....	39
3.8 Desenho de iniciadores e amplificação.....	39
3.9 Purificação de produtos de amplificação	40
3.10 Transformação de bactérias cálcio competentes.....	41
3.10.1 Preparo de células cálcio competentes.....	41
3.10.2 Transformação por choque térmico.....	42
3.11 Clonagem	42
3.12 Eletroforese de proteínas.....	44
3.12.1 Coloração por Coomassie blue	45
3.12.2 Coloração por Nitrato de Prata.....	45
3.12.3 Transferência de proteínas para membrana de nitrocelulose	46
3.13 Expressão de Ub em <i>E. coli</i>	46
3.14 Purificação de Ub recombinante e quantificação	48
3.15 Produção de anticorpos policlonais	49
3.16 Verificação da especificidade dos anticorpos e análise do perfil de ubiquitilação em gel unidimensional	50
3.17 Culturas de <i>T. cruzi</i> e estresse nutricional de epimastigotas.....	51
3.18 Transfecção de <i>T. cruzi</i>	51
3.19 Análise da expressão de Ub recombinante	52
3.20 Enriquecimento de proteínas ubiquitiladas	53
3.20.1 Enriquecimento de proteínas marcadas por Ub nativas.....	53
3.20.2 Enriquecimento de proteínas marcadas por Ub recombinantes.....	54
3.21 Enriquecimento de proteínas de interação com Ub.	55
3.22 Identificação das proteínas de interação com Ub	57
4. RESULTADOS	60
4.1 Desenho de iniciadores e amplificação da Ub	60
4.2 Clonagem nos vetores selecionados	61
4.3 Transformação de <i>E. coli</i> e análise da expressão de Ub recombinante .	63
4.4 Purificação de Ub recombinante e dosagem	64
4.5 Produção de anticorpos para Ub	65
4.6 Transfecção de <i>T. cruzi</i> e análise da expressão de Ub recombinante	69
4.7 Enriquecimento de proteínas ubiquitiladas	70
4.7.1 Ensaio de TAP-tag	70

4.7.2 Imunoprecipitação	71
4.8 Enriquecimento de proteínas de interação com Ub	73
4.9 Identificação de proteínas de interação com Ub	77
5. DISCUSSÃO	82
6. CONCLUSÕES	88
7. PERSPECTIVAS	89
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	4
Figura 2. Representação da estrutura da família de Ub/Ub-like.....	8
Figura 3. O processo de modificação de proteínas por pequenas proteínas Ub e Ub-like.	11
Figura 4. O proteassomo 26S.	21
Figura 5. Alinhamento múltiplo da sequência de Ub de diferentes eucariotos,	23
Figura 6. Desenho dos vetores de clonagem e expressão em <i>E. coli</i>	35
Figura 7. Desenho dos vetores de expressão em <i>T. cruzi</i>	36
Figura 8. Seqüência nucleotídica da Ub de <i>T. cruzi</i>	60
Figura 9. Amplificações do gene para Ub (A) e representação da purificação do produto de amplificação (B).....	61
Figura 10. PCR de plasmídeo e de colônia.	62
Figura 11. Expressão de Ub em células BL21(DE3)pLysE.	63
Figura 12. Purificação de Ub.....	64
Figura 13. Teste de soro pré-imune.	65
Figura 14. Teste de soro imune.....	67
Figura 15. Ensaio de inibição de proteassomo e DUBs.	68
Figura 16. Análise da expressão de Ub recombinante.....	70
Figura 17. Enriquecimento de Ub recombinante com purificação por afinidade em série.....	71
Figura 18. Enriquecimento de Ub recombinante por imunoafinidade.....	72
Figura 19. Afinidade de proteínas de epimastigotas por Ub.....	74
Figura 20. Afinidade de proteínas de epimastigotas estressados por Ub.	75
Figura 21. Controles negativos da afinidade por Ub.	76
Figura 22. Espectros MS representativos das proteínas purificadas na afinidade por Ub	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Ub- <i>like</i> conhecidas em humanos.	9
Tabela 2: Sequências adaptadoras:.....	40
Tabela 3: Soluções e quantidades para preparo de gel de poliacrilamida, para empilhamento e corrida de amostras protéicas.....	45
Tabela 4: Parâmetros usados na busca de proteínas pelo Mascot.....	59
Tabela 5: Características dos iniciadores desenhados para Ub.....	60
Tabela 6. Lista de proteínas de epimastigotas que possuem interação com Ub, identificadas por espectrometria de massas.	78
Tabela 7. Lista de proteínas de epimastigotas submetidos a estresse que possuem interação com Ub, identificadas por espectrometria de massas.	80
Tabela 8. Lista de proteínas comuns entre epimastigotas e epimastigotas submetidos a estresse que possuem interação com Ub, identificadas por espectrometria de massas.	81

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN: Acetonitrila

AMP: adenosina mono-fosfato

ATG: autofagia

ATP: adenosina tri-fosfato

BSA: do inglês, *bovine serum albumin*

CBP: do inglês, *calmodulin binding protein*

CUB: do inglês, *calmodulin-ubiquitin associated*

CUE: do inglês, *Coupling of Ubiquitin conjugation to Endoplasmic reticulum degradation*

Dm28c: clone de *T. cruzi*, isolado do mamífero *Didelphis marsupialis*

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: do inglês, *deoxyribonucleic acid*

dNTPs: desoxiribunucleotídeos

DTT: Ditioneitol

DUB: enzima desubiquitinador

DUIM: do inglês, *Double-sided UIM*

E1: enzima ativadora de ubiquitina

E2: enzima conjugadora de ubiquitina

E3: enzima ubiquitina ligase

E4: fator de extensão de cadeias de poliubiquitinas

EDTA: Ácido etileno-diamino-tetracético

FAT10: do inglês, *F-Adjacent Transcript-10*

FUB1: do inglês, *Fau (Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus – FBR-MuSV - associated ubiquitously expressed gene) Ubiquitin-Like Protein*

FUS: do inglês, *fusion ubiquitin gene*

g: aceleração da gravidade

GAT: Gga e TOM1

GUE: do inglês, *GRAM-Like Ubiquitin-binding in Eap45*

HECT: do inglês, *homologous to E6-AP C-terminus domain*

IAA: Iodoacetamida

Ig: Imunoglobulina

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactosídeo
 ISG15: do inglês, *Interferon-Stimulated Gene-15*
 kb: kilo-base
 kDa: kilo-Dalton
 kDNA: DNA localizado no cinetoplasto (*kinetoplast*)
 LB: Luria-Bertani
 LIT: do inglês, *liver infusion tryptose*
 M: Molar
 mRNA: RNA mensageiro
 MHC: do inglês, *major histocompatibility complex*
 MIU: do inglês, *Motif Interacting with Ubiquitin*
 NEDD8: do inglês, *Neural Precursor Cell-Expressed Developmentally Downregulated-8*
 Ni-NTA: do inglês, *nickel-nitrilotriacetic acid*
 PA: do inglês, *proteasome activator*
 pb: pares de bases
 PCR: do inglês, *polymerase chain reaction*
 PFU: do inglês, *PLAA Family Ubiquitin binding*
 PI: do inglês, *proteasome inhibitor*
 PUB: do inglês, *poly-ubiquitin gene*
 RING: do inglês, *really interesting new gene*
 RNA: do inglês, *ribonucleic acid*
 rRNA: RNA ribossomal
 SCF: do inglês, *SKP1-cullin-F box*
 SDS: sódio dodecil sulfato
 SDS-PAGE: do inglês, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
 SL-RNA: do inglês, *spliced leader RNA*
 SUMO: do inglês, *Small Ubiquitin-Related Modifier*
 T.A.: Tampão de amostra para proteínas
 TAP: do inglês, *tandem affinity purification*
 TAU: do inglês, *triatomine artificial urine*
 TFA: ácido trifluoroacético
 Ub: ubiquitina

Ub-like: do inglês, *ubiquitin like protein*
Uba: do inglês, *ubiquitin activating*
UBA: do inglês, *ubiquitin associated domain*
Ubc: do inglês, *Ubiquitin-Conjugating enzyme*
UBD: do inglês, *ubiquitin binding domain*
UBIP: do inglês, *ubiquitous immunopoietic polypeptide*
UBL5: do inglês, *Ubiquitin-Like Protein 5*
UBM: do inglês, *Ubiquitin-Binding Motif*
UBP: do inglês, *ubiquitin binding proteins*
UBZ: do inglês, *ubiquitin-binding zinc finger domain*
UCH : do inglês, *ubiquitin C-terminal hydrolase*
UEV: do inglês, *Ubiquitin-conjugating Enzyme Variant*
UFD: do inglês, *ubiquitin-fold domain*
UFM: do inglês, *Ubiquitin-Fold Modifier*
UIM: do inglês, *ubiquitin-interaction motif*
ULP: do inglês, *ubiquitin-like specific processing protease*
UPS: do inglês, *ubiquitin-proteasome system*
URM: do inglês, *Ubiquitin-Related Modifier*
VHS: Vps27, HRS, STAM
PAZ/ZnfUBP: do inglês, *Poliubiquitin-Associated Zinc finger*
NZF: Npl4 *Zinc Finger*
ZnF: do inglês, *zinc finger*

Neste texto, empregamos termos estrangeiros para definir estruturas, processos moleculares, métodos, reagentes, entre outros. Mantivemos nesses casos sua denominação original por não existir um glossário em português para estes termos.

RESUMO

Uma série de genes apresenta expressão diferenciada durante o ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. A regulação dessa expressão ocorre neste parasita a nível pós-transcricional e pode estar sendo regulada pela modulação da atividade de proteínas estágio-específicas, através da modificação das mesmas pela ubiquitina (Ub), em um processo conhecido como ubiquitilação. Entretanto, este sistema ainda não é bem caracterizado em *T. cruzi*. Com o objetivo de identificar tais proteínas, o presente trabalho gerou ferramentas importantes para este estudo, como células de *T. cruzi* transfectadas que expressam Ub recombinante fusionada a diferentes etiquetas moleculares, além da produção de anticorpos para Ub de *T. cruzi*. Com isso, diferentes proteínas que interagem com o sistema foram identificadas: uma proteína hipotética (4764.t00006) com domínio de ligação de ubiquitina (UBA); proteínas ligadoras de DNA e RNA como a Alba (4859.t00001) e subunidades ribossomais; proteínas reguladoras do início da tradução, como o fator de iniciação eIF4a (8728.t00019) e a pequena proteína ligadora de GTP (8128.t00005) envolvida na endocitose. Dos mecanismos citados acima, todos são regulados pelo processo de ubiquitilação em outros organismos. Foram identificadas também outras proteínas cuja função ainda não foi descrita, como no caso de algumas proteínas hipotéticas sem domínios conhecidos (4718.t00003 e 8445.t00002, entre outras). Além disso, também foram identificadas proteínas envolvidas em processos celulares nos quais, até o presente momento, não é conhecido o envolvimento da ubiquitilação, como proteínas envolvidas em processos como ciclo de Krebs (7146.t00001), via das pentoses (8033.t00005), ou ainda a gluconeogênese (4917.t00002). O presente trabalho deu início a investigações a respeito dos mecanismos moleculares e biológicos da ubiquitilação em *T. cruzi*. A identificação de proteínas de interação com a ubiquitilação e dos alvos desta sinalização em *T. cruzi* ganha importância para a compreensão do mecanismo de regulação da expressão gênica neste protozoário patogênico.

ABSTRACT

Several genes present differential expression through the life cycle of the protozoan *Trypanosoma cruzi*. Regulation of this expression occurs in this parasite at the post-translacional level and may be regulated by the modulation of the activity of stage-specific proteins, through their modification by ubiquitin (Ub), in a process known as ubiquitination. However, this system is still poorly characterized in *T. cruzi*. Aiming the identification of these proteins, the present work has generated some important tools for this study, such as transfected *T. cruzi* cells that express recombinant Ub fused to different molecular tags, besides the production of antibodies against *T. cruzi* Ub. In this way, different proteins that Interact with the ubiquitination process could be identified: an hypothetical protein (4764.t00006) with an ubiquitin-binding domain (UBA); DNA and RNA binding proteins, such as Alba (4859.t00001) and ribosomal subunits; proteins that regulate the translation initiation, such as the initiation factor eIF4a (8728.t00019) and a small GTP-binding protein (8128.t00005) from the endocytic pathway. All above-mentioned mechanisms are regulated by the ubiquitination process in other organisms. We have also identified other proteins with still not described function, such as some hypothetical proteins with no known domains (4718.t00003 and 8445.t00002, among others). Furthermore, we have also identified proteins involved in cellular processes where, up to now, no ubiquitination is known to occur, such as proteins involved in the Krebs cycle (7146.t00001), in the pentoses pathway (8033.t00005), or even the gluconeogenesis (4917.t00002). The present work has initiated investigations on the molecular and cellular mechanisms of ubiquitination in this primitive organism. Identification of ubiquitin-interacting proteins and of targets for this signalization in *T. cruzi* will help to understand the mechanism of regulation of gene expression in this pathogenic protozoan.

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado membro da família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida (Chagas, 1909). Este organismo tem sido foco de diversos estudos, pois, além de ser o agente causador da Doença de Chagas, ele pertence a um dos grupos mais antigos dos eucariotos – Euglenozoa –, tornando-se um excelente modelo parasitário de estudo.

Estudos recentes indicam que, 100 anos após sua descoberta, a Doença de Chagas ainda acomete cerca de 7,6 milhões de indivíduos na América Latina (WHO, 2007) e não existe profilaxia eficiente por vacinação ou tratamento quimioterápico efetivo.

A forma natural, e a principal, de transmissão da doença é a vetorial, ocorrendo através das fezes de insetos hematófagos, da família *Reduviidae*, contaminados, em especial o *Triatoma infestans* – conhecido popularmente como barbeiro –, que ao fazer o repasto sanguíneo acaba liberando em suas fezes as formas infectivas do parasita (Brener, 1973). Diversas medidas foram tomadas na tentativa de erradicar o *Triatoma infestans* – principal vetor domiciliar da doença –, o que resultou na diminuição desta forma de transmissão. Porém, além de outras espécies de vetores antes considerados secundários na transmissão ocuparem o lugar do *T. infestans*, outras formas de transmissão tornaram-se conhecidas. A transmissão por transfusão sanguínea ganhou grande importância epidemiológica após a migração de indivíduos infectados para os centros urbanos (Coura e cols., 1966; Rohwedder, 1969). Além disso, ainda existem relatos de transmissão congênita (Schenone e cols., 1987), através do leite materno (Medina-Lopes, 1983), acidentes laboratoriais (Brener, 1979) e por contaminação via oral (Amato Neto e cols., 2000).

A doença de Chagas se manifesta em duas fases distintas. A fase aguda da doença, quando sintomática, caracteriza-se por parasitemia elevada, febre, mal-estar, cefaléia, adenopatia, edema cutâneo, disfunção cardíaca, hepatomegalia e esplenomegalia. A letalidade dessa fase pode ser em

decorrência de meningoencefalite e insuficiência cardíaca (Rassi e cols, 2000). Os casos agudos não tratados podem evoluir para fase crônica, onde a maioria dos pacientes é assintomática (forma crônica indeterminada), e outros manifestam distúrbios cardíacos e digestivos, como megacólon (forma crônica determinada) (Dias, 2000). A doença crônica tem como importante manifestação a dilatação congestiva do coração que pode ocorrer anos após a infecção aguda.

Do ponto de vista epidemiológico, as formas crônicas determinadas são as que causam os maiores impactos médico-sociais, particularmente a cardiopatia crônica, com a conseqüente perda de produtividade, impedimento ao trabalho, comprometimento de órgãos vitais, podendo acarretar óbito. Muitos casos de formas crônicas determinadas apresentam uma evolução muito lenta, compatível com muitos anos de vida. No entanto, muitos casos, principalmente as cardiopatias chagásicas, acabam tendo uma evolução grave, com comprometimento cardíaco, sobrevivendo a morte por insuficiência cardíaca, arritmias graves e, também, por tromboembolismos (Puigbó e cols, 1993; Guimarães, 1997).

As drogas nifurtimox e benzonidazol têm sido usadas no tratamento da Doença de Chagas, porém são drogas que apenas são eficazes na fase aguda da doença, além disso, causam sérios efeitos colaterais e existem evidências de parasitos resistentes a ambos compostos (Filardi e Brener, 1987).

1.2 Ciclo de Vida do *T. cruzi*

O *T. cruzi* parasita dois hospedeiros, um inseto e um mamífero. Este protozoário possui um ciclo de vida complexo, caracterizado pela alternância entre formas replicativas e infectivas que variam de acordo com estímulos recebidos dos diferentes microambientes habitados (Figura 1).

O ciclo de vida deste organismo pode ser classificado em silvestre, peridomiciliar e domiciliar, conforme os hábitos de seus hospedeiros (Forratini, 1980). No ciclo silvestre, o *T. cruzi* circula entre triatomas e reservatórios silvestres, como roedores, marsupiais e outros animais silvestres (Barreto, 1979).

O ciclo domiciliar depende de muitos fatores ecológicos e antropológicos, mas em grande parte ocorre devido ao deslocamento de colônias de insetos vetores de seus ambientes naturais para o ambiente doméstico, tais como fendas de construções de barro principalmente em áreas rurais, fazendo do homem um reservatório natural do *T. cruzi* (Barreto, 1979).

O ciclo peridomiciliar ocorre devido à livre circulação, nas residências, de mamíferos como roedores, cães, gatos e marsupiais e também pela atração de triatomíneos silvestres às casas pela luz e alimento. Deste modo, há uma dinâmica interação entre os ciclos silvestre e doméstico (Schmuñis, 2000).

No hospedeiro invertebrado, o ciclo biológico do *T. cruzi* se inicia no repasto sanguíneo com a ingestão de tripomastigotas presentes no sangue do mamífero infectado do qual o inseto está se alimentando. Após alguns dias as formas tripomastigoas ingeridas diferenciam-se em formas epimastigotas no estômago do inseto vetor, estas por sua vez migram para o intestino médio e se multiplicam por fissão binária. A intensa replicação de epimastigotas resulta no aumento significativo da população de parasitas no intestino do inseto e, como consequência, diminui a disponibilidade de nutrientes. Tais condições levam ao estresse do parasita, que faz os mesmos se aderirem ao epitélio do intestino posterior do triatomíneo para então se diferenciarem nas formas tripomastigotas metacíclicas. Durante seu novo repasto sanguíneo, o barbeiro elimina juntamente com as fezes algumas formas epimastigotas não diferenciadas e as formas tripomastigotas metacíclicas que, em contato com ferimentos - como o da picada do inseto - ou com a mucosa do mamífero, levam à infecção do mesmo (Brener, 1979; De Souza, 1984; Revisto por Tyler & Engman, 2001). O processo de diferenciação de formas epimastigotas replicativas para tripomastigotas metacíclicas infectivas é conhecido por metaciclogênese.

As formas metacíclicas acabam por penetrar a célula hospedeira, formando o vacúolo parasitário onde se inicia a diferenciação em formas amastigotas, que rompem o vacúolo e se proliferam no citoplasma da célula. A grande densidade intracelular de parasitas leva a uma nova diferenciação, desta vez para formas tripomastigotas sanguíneas, as quais rompem a célula e são liberadas no sangue, juntamente com formas intermediárias e amastigotas, onde podem invadir novas células ou serem ingeridas pelo barbeiro em seu

repasto sanguíneo, fechando o ciclo (Brener, 1979; De Souza, 1984; Revisto por Tyler & Engman, 2001). A amastigogênese consiste na diferenciação de formas tripomastigotas metacíclicas em formas amastigotas replicativas, na célula do hospedeiro vertebrado.

A metacilogênese e a amastigogênese podem ser reproduzidas *in vitro* (Contreras e cols., 1985, Contreras e cols., 2002), o que possibilita o estudo das formas intermediárias nas diferentes fases de diferenciação. As notáveis modificações morfológicas, metabólicas e comportamentais do *T. cruzi* durante a metacilogênese, fizeram desse processo um modelo escolhido para ser estudado por nossa equipe no Instituto Carlos Chagas – ICC –, uma vez que o estudo dos mecanismos envolvidos na diferenciação, sobretudo para formas infectivas, pode contribuir para o controle da doença e de sua transmissão.

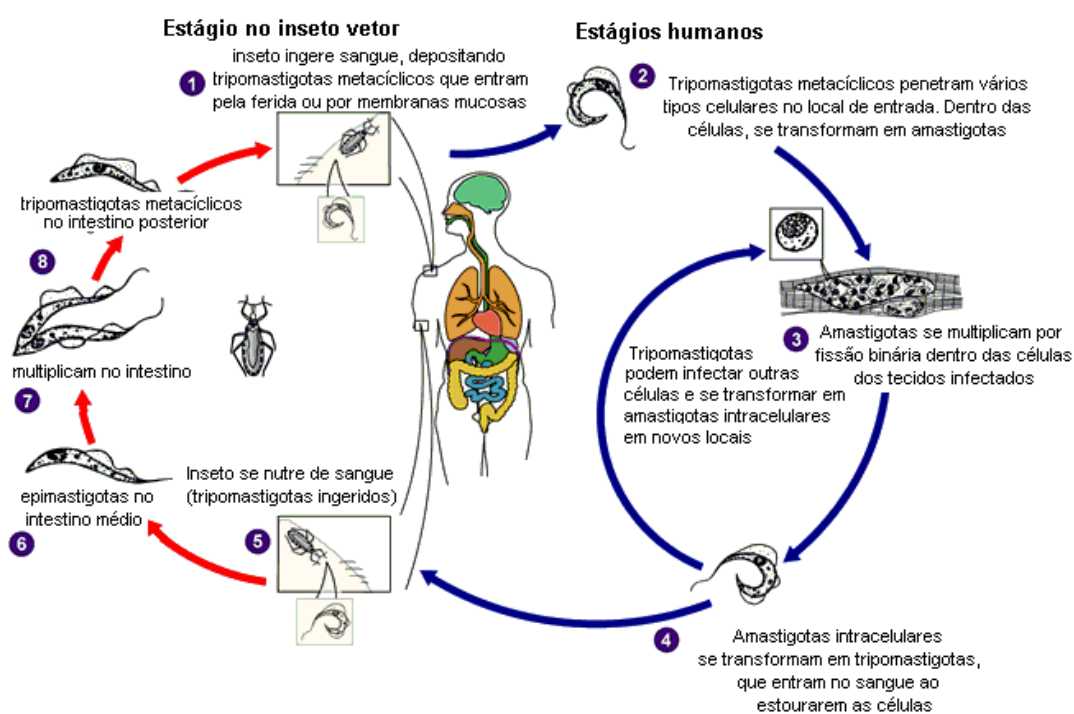


Figura 1: Ciclo de vida de *T. cruzi*
(modificado de www.dpd.cdc.gov/dpdx)

1.3 Genoma e expressão gênica em *T. cruzi*

Os tripanossomatídeos possuem características peculiares na sua organização genômica: 20 a 25% de todo o conteúdo de DNA está condensado

no cinetoplasto, uma estrutura típica da ordem Kinetoplastida localizado em uma porção de sua mitocôndria única. O DNA do cinetoplasto (kDNA) é organizado em maxicírculos e minicírculos – 40-50 maxicírculos de 22 a 28 kb que correspondem ao DNA mitocondrial dos eucariotos e 5.000-10.000 minicírculos de aproximadamente 1,5 kb com seqüências altamente variáveis (Revisto por Shapiro e Englund, 1995; Silveira, 2000). Os maxicírculos contêm genes codificadores de RNA ribossomal e de proteínas mitocondriais. Os minicírculos não contêm genes codificadores de proteínas, seus genes geram transcritos conhecidos por RNAs guias que estão envolvidos na edição de RNA (Schnauffer e cols, 2001; Simpson e cols, 2000)

A estrutura e organização cromossômica nos tripanossomatídeos também possuem suas particularidades: os cromossomos não se condensam durante a divisão celular, tornando difícil a visualização de cromossomos metafásicos e de estimar o número exato dos mesmos nos membros deste grupo (Vickerman e Tetley, 1977). Através de técnicas de eletroforese de campo pulsado e hibridação teloméricas (Schwartz e Cantor, 1984) foi possível identificar bandas cromossômicas nestes parasitas. O genoma nuclear do *T. cruzi* consiste, em média, de 43 a 50 Mb de DNA distribuídos entre 30 a 40 bandas cromossômicas que apresentam tamanhos de 0,45 a 4,0 Mb.

O *T. cruzi* apresenta em seu genoma longas unidades de transcrição policistrônica, com vários genes agrupados sequencialmente, os quais, em geral, não apresentam nenhuma relação funcional entre eles (Ullu e Tschudi, 1995; Johnson e cols., 1987; Kooter e cols., 1987). Em geral não ocorrem introns em seus genes, o processamento do transcrito policistrônico para gerar mRNA maduro monocistrônico é realizado através de *trans-splicing* e poliadenilação. O processamento por *trans-splicing* ocorre com a finalidade de inserir na extremidade 5' de moléculas de RNA codificadoras de proteína uma sequência de RNA de 39-41 nucleotídeos conhecida como mini-exon ou *spliced leader* RNA (SL-RNA) (Vanhamme e Pays, 1995; Teixeira, 1998). O gene codificador de ubiquitina (Ub) está entre um dos exemplos de transcrição policistrônica, sendo encontrado em *T. cruzi* na mesma unidade policistrônica do gene codificador para calmodulina (Chung e Swindle, 1990).

São descritos em *T. cruzi* apenas promotores para RNA polimerase I e o promotor do gene do mini-éxon, que é transcrito por uma RNA polimerase II

(Dietrich e cols., 1993; Nunes e cols., 1997). Os genes que codificam as três RNA polimerases clássicas de eucariotos foram descritos nos tripanossomatídeos (revisto por Vanhamme e Pays, 1995; Lee e Van der Ploeg, 1997). Todavia o desconhecimento de promotores para RNA polimerase II em genes que codificam proteínas, o fato de proteínas originadas do mesmo transcrito policistrônico poderem apresentar padrões de expressão diferentes e por existir uma expressão gênica estágio-específica durante a diferenciação do *T. cruzi* geram evidências de que a regulação da expressão gênica acontece ao nível pós-transcricional neste organismo (Revisto por Teixeira e DaRocha, 2003). Sendo assim, acredita-se que os genes de *T. cruzi* são continuamente transcritos, e a regulação deve ocorrer no transporte seletivo de mRNA para o citoplasma, ou na estabilidade do mRNA ou mesmo pela mobilização polissomal diferencial dessas moléculas, selecionando os mRNA que devem ser transcritos em momentos específicos do ciclo (Ávila e cols, 2001; Dallagiovanna e cols, 2001; Fragoso e cols, 2003). Um dos mecanismos de regulação da expressão gênica ao nível pós-traducional conhecido em eucariotos é a ubiquitilação, que consiste na marcação de proteínas-alvo por moléculas de Ub, encaminhando-as a diferentes destinos, entre eles a degradação.

Em 2005 o seqüenciamento do genoma de *T. cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania major* foi realizado através de um consórcio internacional (El-Sayed e cols., 2005). O genoma do clone CL Brener foi seqüenciado usando a estratégia WGS (*whole genome shotgun*) com cobertura de 14x, indicando a existência de 22570 genes codificadores de proteínas, dos quais 12570 representam pares de alelos. Foi possível atribuir função a 50.8% dos genes codificadores de proteínas preditos com base em resultados de similaridade com proteínas já caracterizadas ou na presença de domínios funcionais característicos (El-Sayed e cols., 2005). Os dados sobre a porção montada e anotada do genoma de *T. cruzi*, encontram-se disponíveis no site www.genedb.org.

1.4 Proteínas modificadoras

Atualmente, a principal família de proteínas conhecidas por modificarem outras proteínas é a família das ubiquitinas (Ub). Esta família se divide em 2 grupos relativamente distintos: um grupo constituído pela própria ubiquitina, e outro grupo que abrange as demais proteínas modificadoras, conhecidas como *Ub-like* (proteínas semelhantes à Ub).

1.4.1 Ubiquitina

A Ub é uma proteína globular que apresenta 76 resíduos de aminoácidos e massa molecular equivalente a 8,5 kDa (Fig 2A). Ela foi identificada por G. Goldstein e colaboradores como uma proteína, até então de função desconhecida, altamente conservada em diferentes organismos – células animais, leveduras, bactérias e plantas superiores – e foi nomeada por eles como UBIP – do inglês, *ubiquitous immunopoietic polypeptide* – pois estava relacionada com a indução da diferenciação de células B (Goldstein e cols., 1975). Em seu trabalho seguinte, Goldstein passa a nomear esta proteína como ubiquitina (Goldstein e Schlesinger, 1975).

Em eucariotos a ubiquitina é expressa em 3 diferentes precursores: polímeros de poliubiquitinas (Sharp e Li, 1987) e outras 2 moléculas, Ub_{L40} e Ub_{S27}, que são ubiquitinas fusionadas a polipeptídeos ribossomais, L40 e S27 respectivamente (Baker e Board, 1991). Estes precursores são clivados por endopeptidases específicas, gerando moléculas idênticas de ubiquitinas, que são utilizadas no processo de sinalização protéica.

A primeira proteína citada por ser modificada por ubiquitina foi a histona 2A (Goldknopf e Busch, 1977) preferencialmente em seu sítio ativo, sugerindo um papel na regulação transcricional (Levinger e Varshavsky, 1982). Outro caso relatado especulava uma possível função na meia-vida / degradação de globinas modificadas por ubiquitina (Ciechanover e cols., 1978). Finalmente, na década de 80, trabalhos demonstraram o envolvimento da ubiquitina na degradação seletiva de proteínas (Hershko e cols., 1980; Ciechanover e cols., 1980; Wilkinson e cols., 1980).

A atribuição do prêmio Nobel em Química de 2004 para I. Rose, A. Ciechanover e A. Hershko pela contribuição na descoberta da proteólise mediada por ubiquitina, gerou um grande interesse da comunidade científica em estudar esta modificação e suas funções na célula. Com o avanço da ciência e a intensa investigação do papel desta ubíqua proteína, diversos estudos vêm mostrando o envolvimento direto da ubiquitina em quase todos os processos celulares, regulando os destinos e funções de inúmeras proteínas.

1.4.2 Proteínas semelhantes à ubiquitina (Ub-like)

Desde a descoberta da Ub, inúmeras pequenas proteínas relacionadas à Ub e conhecidas como Ub-*like* têm sido descritas (Tabela 1). Tais proteínas não possuem necessariamente alta similaridade entre suas sequências, porém sua estrutura tridimensional é basicamente a mesma (Fig. 2). O modo de ligação entre as Ub-*like* e seus alvos é bem semelhante, envolvendo o resíduo de glicina carboxi-terminal (C-terminal) da Ub-*like*. Igualmente, todas estas proteínas precisam de enzimas ativadoras, conjugadoras e ligadoras de Ub-*like* (Hochstrasser, 2000).

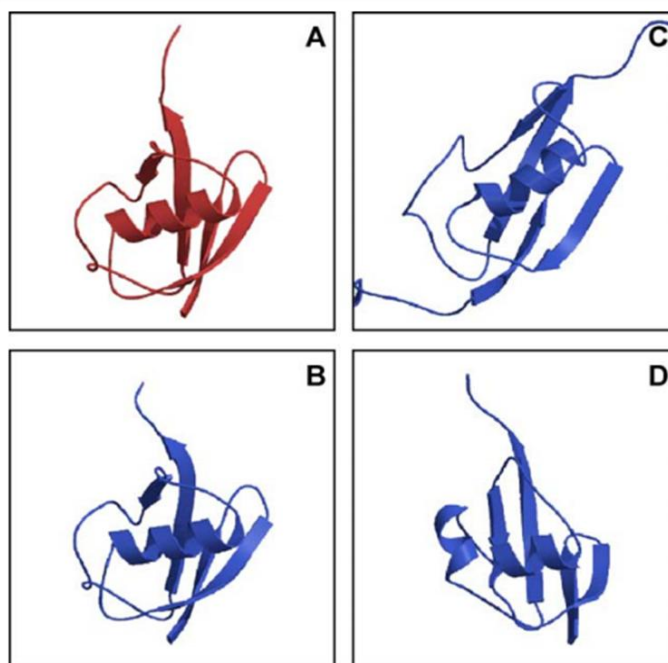


Figura 2. Representação da estrutura da família de Ub/Ub-*like*.

(A) Ubiquitina (Vijay-Kumar e cols., 1987); (B) Nedd8 (Whitby e cols., 1998); (C) SUMO-1 (Bayer e cols., 1998); (D) ThiS (Wang e cols., 2001). Fonte: Pickart e Eddins, 2004.

Ub-like	Identidade com Ub	Função	Referências
NEDD8	58%	Regulação de E3, regulação transcricional de p53, degradação por proteassomo	-Hori e cols, 1999 -Wu e cols, 2005 -Xirodimas e cols, 2004
SUMO	18%	Controle da localização, função e estabilidade de proteínas, antagonista da ubiquitilação, regulação da transcrição	-Gill, 2004 -Johnson, 2004
SUMO-2 SUMO-3	16%	Regulação transcricional e de progressão do ciclo celular	-Eaton e Sealy, 2003 -Azuma e cols, 2003
ISG15	29,37%	Regulador da resposta imune relacionada a IFN, crescimento e diferenciação celular	-Giannakopoulos e cols, 2005 -Zhao e cols, 2005
FAT10	29,36%	Degradação por proteassomo, checagem na montagem do fuso (ciclo celular)	-Raasi e cols, 2001 -Hipp e cols, 2005
FUB1	37%	Ativação de células T	-Nakamura e Tanigawa, 2003
UBL5	22%	Splicing de pré-RNA	-Wilkinson e cols, 2004 -Luders e cols, 2003
URM1	12%	Resposta a estresse oxidativo, via TOR de sinalização	-Goehring e cols, 2003
ATG8	10%	Autofagia	-Ichimura e cols, 2000
ATG12	17%	Autofagia	-Mizushima e cols, 1998
UFM1	16%	Resposta ao estresse endoplasmático	-Komatsu e cols, 2004

Tabela 1: Ub-like conhecidas em humanos.

A tabela mostra a porcentagem de identidade de cada Ub-like com a Ub de humanos e suas respectivas funções na célula. ISG15 e FAT10 possuem dois domínios de Ub cada, por isso possuem 2 valores diferentes de identidade com Ub. Adaptado de Welchman e cols, 2005.

A maioria das Ub-like, assim com a Ub, é expressa como precursores inativos, que necessitam de processamento por proteases específicas para expor o sítio di-glicina necessário para a conjugação ao substrato.

Cada membro da família das Ub desempenha uma função diferente na célula, por isso, com a utilização destas proteínas, a célula pode criar diferentes tipos de modificações, as quais podem ser reconhecidas por diferentes reguladores, controlando inúmeros processos celulares.

Apesar de bactérias não possuírem proteínas funcionalmente análogas à Ub ou Ub-like, elas apresentam proteínas que compartilham a estrutura da família das Ub, essas proteínas são ThiS (Fig. 2D) e Moad, que são facilitadoras da inserção de enxofre nos co-fatores orgânicos tiamina e molibdopterina, respectivamente, e o sistema de ativação destas moléculas é similar ao sistema de ubiquitilação, porém, essas proteínas não se ligam

covalentemente ao substrato para modificá-los, e sim facilitam a inserção de enxofre nos mesmos (revisto por Hochstrasser, 2000).

Existem ainda proteínas que possuem domínios Ub, mas não são modificadoras de outras proteínas, pois não possuem a capacidade de se ligar covalentemente aos substratos de ubiquitilação. Este é o caso da parkina, uma enzima ligadora de Ub (E3) que possui o domínio Ub para ser reconhecida por um motivo de interação com Ub (UIM) da proteína eps15, a qual é ubiquitilada no momento da interação com a parkina (Woelk e cols, 2006).

1.5 Processo de modificação / ubiquitilação

Um dos mecanismos de regulação pós-traducional conhecido em eucariotos é a ubiquitilação, que consiste na marcação de proteínas-alvo por moléculas de Ub, encaminhando-as a diferentes destinos, sendo os mais conhecidos: ativação ou inativação da proteína marcada, mudança de localização ou função e degradação. Este processo, bem como seus componentes, foi descrito pela primeira vez em 1983 (Hershko e cols., 1983)

A ligação covalente de Ub – ubiquitilação – ocorre entre um resíduo de lisina do alvo protéico e um resíduo de glicina C-terminal da ubiquitina, este processo é dependente de ATP. A ubiquitilação de proteínas (Figura 3) envolve três principais enzimas: enzima ativadora de Ub (E1), enzima conjugadora de Ub (E2) e enzima Ub ligase (E3) (Revisto por Hershko e Ciechanover, 1998; Ciechanover, 1998), além de fatores extensores de cadeia - E4 - (Hoppe, 2005) e as enzimas desubiquitiladoras (DUB) (revisto por Kim e cols., 2003).

A enzima E1 inicialmente faz a adenilação da extremidade C-terminal da Ub para, então, formar uma ligação tioéster entre o resíduo de cisteína catalítico da E1 e a extremidade C-terminal da Ub, em uma reação dependente de ATP (Haas e Rose, 1982). Em seguida, a Ub ativada é passada para o resíduo de cisteína contido no sítio ativo de uma E2, formando uma ligação tioéster. A E2 possibilita o encontro entre a Ub ativada e o substrato protéico e, juntamente com uma E3, forma uma ligação isopeptídica entre um resíduo de glicina na extremidade C-terminal da Ub e um resíduo de lisina do substrato,

embora existam evidências de ubiquitilação de resíduos amino-terminais de algumas proteínas alvos (Revisto por Ciechanover e Ben-Saadon, 2004).

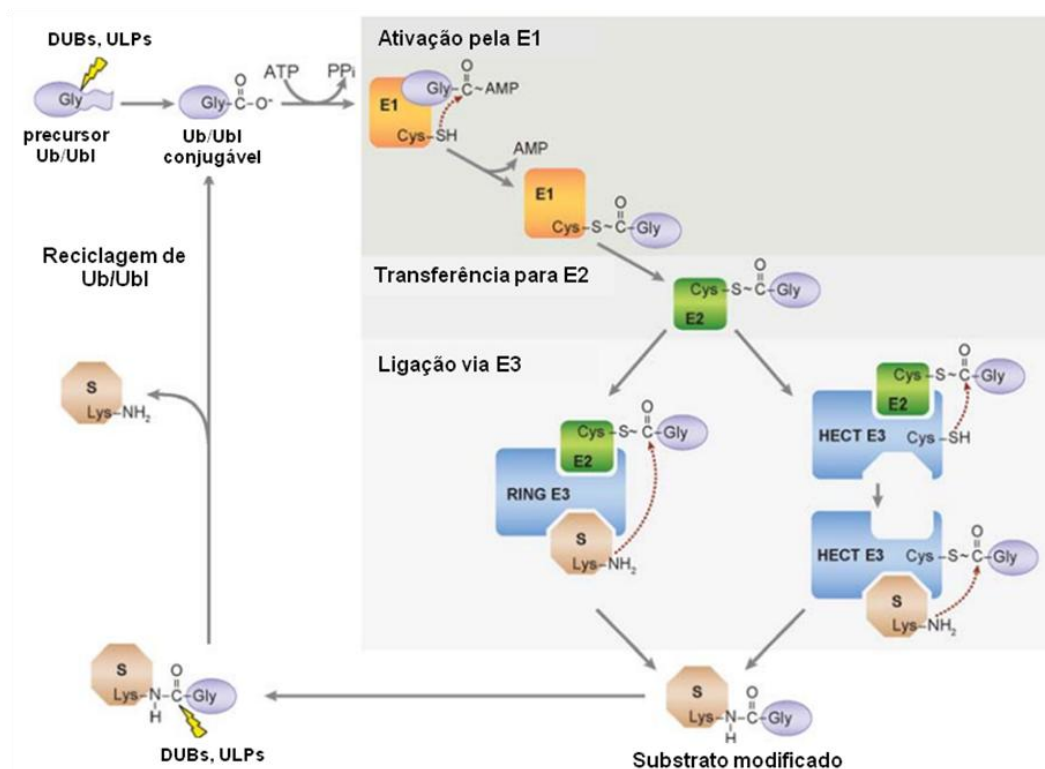


Figura 3. O processo de modificação de proteínas por pequenas proteínas Ub e Ub-like. Primeiramente os precursores de Ub/Ub-like precisam ser processados por proteases específicas para expor o resíduo de glicina carboxi-terminal. A Ub/Ub-like é então ativada pela E1, carregada pela E2 até a E3, que juntas fazem a ligação da Ub/Ub-like ativada ao substrato (S). Este processo é reversível devido a ação de proteases específicas, como as DUBs. Adaptado de Kerscher e cols, 2006.

O processo de ubiquitilação pode ocorrer de três formas: monoubiquitilação, pluriubiquitilação ou poliubiquitilação que direcionam a proteína modificada a destinos diferentes (Revisto por Weissman, 2001, Welchman e cols., 2005).

A monoubiquitilação é a ligação de uma única Ub ao alvo protéico. Diversas funções celulares são relacionadas a essa modificação (Revisto por Hicke, 2001), tais como mudança de atividade ou localização da proteína marcada (Haglund e Dikic, 2005), sinal para internalização de proteínas no processo de endocitose (Hicke e Dunn, 2003), para degradação via lisossomo (Hicke, 2001) e para a regulação da transcrição pela modificação de histonas e fatores de transcrição (Daniel e cols., 2004; Hoege e cols., 2002; revisto por Muratani e Tansey, 2003).

A ligação de uma única Ub a diversos resíduos de lisina da proteína alvo é conhecida como pluriubiquitilação e também está envolvida em processos celulares, como a internalização de proteínas de membrana (Horak e Wolf, 2001; revisto por Mukhopadhyay e Riezman, 2007).

A poliubiquitilação consiste na adição de uma cadeia de Ubs ligada à proteína alvo. A cadeia de poliubiquitinas é formada a partir da ligação entre um dos 7 resíduos de lisina existentes na Ub já ligada ao substrato e o resíduo de glicina C-terminal da Ub a ser acoplada à cadeia. A função mais conhecida e mais estudada da poliubiquitilação de substratos protéicos é a proteólise mediada pelo proteassomo 26S (revisto por Glickman e Ciechanover, 2002), o qual reconhece o sinal gerado pela polimerização de Ub ligadas pelo resíduo de lisina 48 (K48) da Ub previamente ligada ao substrato, apesar de existirem diversos estudos mostrando a capacidade do proteassomo de reconhecer e degradar outras modificações por ubiquitilação, como a monoubiquitilação (Boutet e cols., 2007), e cadeias formadas pela ligação de lisinas 11 ou 63 – K11 e K63 – (Baboshina e Haas, 1996; Hofmann e Pickart, 2001). A possibilidade de formar cadeias de poliubiquitinas entre lisinas diferentes, permite a geração de uma vasta diversidade de sinais na célula, por exemplo, a formação de cadeia de ubiquitinas ligadas pelas lisinas 11, 29 e 63 são sinalizações envolvidas na endocitose, reparo de DNA, regulação da função de ribossomos. Outra maneira de gerar sinalizações ainda mais complexas é a formação de cadeias de poliubiquitinas ramificadas, que ainda não se sabe ao certo qual a sua função, mas existem evidências do seu envolvimento na regulação da atividade de E3 (revisto por Woelk e cols., 2007).

Além da função proteolítica da cadeia de poliubiquitinas, outras funções não-proteolíticas são evidenciadas para esse tipo de modificação, como a regulação do fator de transcrição Met4, através da modificação por cadeia de poliubiquitinas ligadas por K48 (Flick e cols., 2004), e reparo de DNA através da modificação de antígenos nucleares de proliferação celular (PCNA) – uma proteína que bloqueia o deslizamento da DNA-polimerase, envolvida na síntese e reparo de DNA – (Hoege e cols., 2002).

A utilização de Ub-*like* na modificação de proteínas é outra forma de obter diferentes sinalizações e consequentemente diferentes funções, como já mencionado anteriormente. Cada Ub-*like* possui sua própria maquinaria de

conjugação, que pode ser compartilhada com outros membros da família de Ub, mas geralmente é exclusiva. Também possuem proteínas de interação diferentes, controlando diversos processos celulares. Quase todas as Ub-*like* são conjugadas à proteína alvo como monômeros, pois são incapazes de formar cadeias, com exceção da família de proteínas modificadoras SUMO (*small ubiquitin related modifier*): seus membros SUMO-2 e SUMO-3 podem formar cadeias.

1.6 Componentes da via de ubiquitilação / modificação

1.6.1 Enzima ativadora de Ub (E1)

A atividade da E1 foi descrita pela primeira vez por Hass e Rose em 1982. A E1 é uma enzima essencial para a ubiquitilação, uma vez que esta promove a ativação da Ub/Ub-*like* para poder ser utilizada no processo de modificação protéica. O resíduo de glicina C-terminal da Ub/Ub-*like* é ativado pela E1 na presença de ATP e Mg^{2+} . Inicialmente ocorre a formação intermediária de um adenilato de Ub/Ub-*like*, o qual serve de doador desta Ub/Ub-*like* para um grupo sulfidril de um resíduo de cisteína da E1, o sítio ativo da E1. Há o consumo de uma molécula de ATP, sendo liberado AMP e pirofosfato (Pickart, 2001). Esta E1 contendo uma Ub/Ub-*like* ativada em seu sítio cisteína pode promover a adenilação de outra Ub/Ub-*like* livre (Nalepa *et al.*, 2006).

Cada membro da família das Ub possui uma E1 específica, esta especificidade é importante, pois a E1 também reconhece e transfere a Ub/Ub-*like* para uma E2 específica, assegurando uma correta sinalização e destino (Lee e Schindelin, 2008). A preferência de E1 por membros da família de Ub particulares provém do resíduo aminoacético existente na posição 72 da E1, que é uma arginina quando se trata da Ub, uma alanina no caso de NEDD8 e uma glutamina ou glutamato para SUMO (Bohnsack e Haas, 2003; Walden e cols., 2003; Whitby e cols., 1998).

Todas as E1 de eucariotos possuem 2 repetições de um domínio que ligam à Ub/Ub-*like* específica e ATP e são os responsáveis pela adenilação da

Ub/Ub-like (Lake e cols., 2001; Lois e Lima, 2005). Outro domínio encontrado em E1 é o domínio ativo da enzima, que contém o resíduo de cisteína. Um terceiro domínio encontrado é o domínio de recrutamento de E2, conhecido como “*ubiquitin-fold domain*” – UFD – (Huang e cols., 2005; Lois e Lima, 2005).

A E1 de algumas Ub-like são conhecidas: A Uba2 (E1) é responsável pela ativação das SUMO, Uba3 (E1) pela ativação de Nedd8, UbeL1 (E1) pela ativação de ISG15, Atg7 (E1) é responsável pela ativação tanto de Atg8 quanto de Atg12, a Uba4 (E1) faz a ativação da Urm1 e a Uba5 (E1) ativa a UFM1. As E1 responsáveis pelas Ub-like Fat10, FUBI e Hub1 ainda não foram caracterizadas.

Na maioria dos eucariotos apenas um tipo de E1 é responsável pela ativação da Ub, a Ube1/Uba1. Recentemente foi descoberta em humanos um segundo tipo de E1 para Ub, com aproximadamente 40% de similaridade com a Ube1, nomeada Uba6 (Jin e cols, 2007). Ube1 e Uba6 possuem preferência por E2 diferentes, distinção esta que é possível pela seqüência do domínio UFD diferente, encontrado em cada E1.

1.6.2 Enzima conjugadora/carreadora de Ub (E2)

A E2 é também outra família de enzimas de grande importância para a conjugação de Ub, pois é neste nível do processo onde a especificidade do sistema pelo substrato começa a atuar.

As E2, devido sua maior especificidade pelo substrato, são mais numerosas que as E1. Em *Saccharomyces cerevisiae* foram encontrados 13 genes codificadores de E2 (Ubc1-Ubc13), das quais duas são E2 de SUMO e Nedd8, a Ubc9 e Ubc12 respectivamente (Hochstrasser, 1996).

Todas as E2 possuem um domínio conservado de aproximadamente 150 resíduos de aminoácidos, conhecido como domínio UBC (do inglês, Ub carrier) que contém o resíduo de cisteína necessário para a ligação tio-éster com a Ub e possui aproximadamente 35% de similaridade entre os membros desta família. As E2 podem ser divididas em 3 grupos de acordo com sua estrutura: a classe I é constituída unicamente de 1 domínio UBC, a classe II que contém uma extensão C-terminal e a classe III que possui uma extensão N-terminal. Possivelmente tais extensões são importantes para a interação com

E3 (Pickart, 2001), apesar das enzimas da classe I também apresentarem interação com E3.

Geralmente o processo de ligação da Ub no substrato utiliza as enzimas E1, E2 e E3, sendo a última a responsável pela ligação da Ub na proteína alvo. Porém, estudos recentes têm demonstrado a existência de ubiquitilação de proteínas sem o envolvimento das E3 (Hoeller e cols, 2007). Além disso, em 2003 já havia a sugestão de que as E2 eram capazes de catalisar a ligação covalente entre a Ub e o substrato através de um resíduo de asparagina altamente conservado, resíduo este que era essencial para a formação desta ligação isopeptídica, mas não para a ligação entre a Ub e a E2 e entre a E2+Ub e a E3 (Wu e cols, 2003).

1.6.3 Enzima ligadora de Ub / Ub ligase (E3)

As Ub ligases, ou E3, conferem a especificidade do processo de ubiquitilação ao substrato. Devido este fator os membros existentes nesta família de enzimas são bastante numerosos, existindo centenas de E3 preditas através da busca por domínios conhecidos que as constituem. Além disso, elas apresentam uma grande variedade entre os seus componentes.

As E3 ligam-se ao mesmo tempo à E2 conjugada à Ub e ao substrato. Até o momento foram caracterizadas 3 classes de E3 com base em seus domínios de interação com substratos e/ou E2. As primeiras duas classes descritas foram HECT (Huibregtse e cols., 1995), e RING *finger* (Jackson e cols., 2000). Outra classe descrita recentemente é a U-box (Aravind e Koonin, 2000). Essas três classes são mecânica e estruturalmente distintas entre si.

O domínio HECT (do inglês, *Homologous to E6-accessory protein Carboxy Terminus*) é constituído de uma sequência de 350 resíduos de aminoácidos que contém um resíduo de cisteína conservado, o qual forma uma ligação tio-éster com a Ub antes de transferi-la ao substrato protéico (Huibregtse e cols., 1995). Este domínio foi descoberto em linhagens de papillomavirus humano oncogênicas, as quais codificam proteínas responsáveis pela inativação da proteína supressora de tumor p53, estas proteínas são a E6 e a proteína associada a E6 (E6-AP). A E6-AP é uma E3, e a proteína E6 atua como um adaptador entre a E6-AP e p53, possibilitando a

ubiquitilação da última (Scheffner e cols, 1993). A caracterização da E6-AP levou à identificação de uma família de proteínas relacionadas à ela, as quais possuíam o mesmo domínio HECT (Huibregtse e cols., 1995).

Ao domínio RING *finger* (do inglês, *Really Interesting New Gene*) era atribuído um papel na dimerização de proteínas no início da década de 90. Mais tarde, estudos começam a relatar o envolvimento desses domínios na ubiquitilação de proteínas (Lorick e cols, 1999). Este domínio permite, devido à presença das cisteínas e histidinas, a contenção de dois átomos de zinco numa conformação espacial característica, *cross-brace*. Diferente das E3-HECT, as E3-RING *finger* não se ligam à Ub/Ub-like, e sim atuam como facilitadoras da interação entre as E2 e o alvo protéico (Hatakeyama e cols., 2001). Esta é a classe de E3 mais numerosa, e ela se divide em 2 subgrupos: as RING *finger* simples, composta de apenas uma unidade protéica, e os complexos de multicomponentes organizados por várias subunidades protéicas (Robinson e Ardley, 2004). Um membro do subgrupo de RING-*finger* simples é a N-recoginin ligase que regula o processo de ubiquitilação N-terminal (do inglês, *N-end rule*) (Mogk e cols, 2007). As E3-RING *finger* que atuam em complexos são as SCF (Skp1/Cullin/F-box/Rbx1/2), e as APC/C (do inglês, *anaphase-promoting complex/cyclosome*).

As E3-U-box são RING *finger* modificadas, que não possuem os resíduos de cisteína e histidina característicos e consequentemente não ligam-se a íon metálicos. A estrutura deste domínio mantém-se graças à uma rede de ligações intra-moleculares de hidrogênio (Ohi e cols., 2003). Elas foram inicialmente classificadas como E4 (Hatakeyama e cols., 2001), pois também são responsáveis pela extensão da cadeia de poliubiquitinas.

1.6.4 Enzima de-ubiquitinadora (DUB)

A ubiquitilação de substratos protéicos é um processo reversível devido à atuação de enzimas que desfazem esta modificação, enzimas estas conhecidas como de-ubiquitinadoras (DUB) ou proteases específicas de Ub-*like* (ULP).

Dentre as funções atribuídas ao processo de de-ubiquitilação estão o resgate de proteínas que seriam degradadas pelo proteassomo, a reciclagem

de Ub, controle do tráfego protéico, e ainda as DUB/ULP estão envolvidas no processamento de moléculas precursoras de Ub (revisto por Love e cols, 2007).

Apesar de o mecanismo de especificidade das DUB/ULP por seus substratos ubiquitilados ser pouco conhecido, porém muito estudado recentemente, sabe-se que estas proteases existem em número tão grande quanto as E3. Estudos de bioinformática recentes sugerem a existência de aproximadamente 100 diferentes DUB/ULP no genoma de humanos (Nijman e cols, 2005).

As DUB/ULP de eucariotos são divididas em 5 grupos, 4 são cisteíno-proteases e 1 é uma metallo-protease dependente de zinco (Amerik e Hochstrasser, 2004; Nijman e cols, 2005).

As cisteíno-proteases contêm as famílias: hidrolases C-terminal de Ub (UCH), proteases específicas de Ub (USP), proteases com domínio de proteínas da doença Machado-Joseph (MJD) e proteases de tumor de ovário (OTU). (revisto por Reyes-Turcu e Wilkinson, 2009).

As famílias de cisteíno-proteases possuem um domínio conhecido como tríade catalítica, que envolve os resíduos de aminoácidos cisteína, histidina e aspartato. A família UCH foi a primeira cisteíno-protease a ser identificada (Pickart e Rose, 1985; Rose e Warms, 1983). Elas são enzimas que hidrolisam esterases e amidas C-terminais da Ub e que possuem um papel fisiológico na reciclagem de Ub e no processamento de precursores de Ub (Larsen e cols. Science. 2002 Oct 18;298(5593):611-5., 1998), apesar de outras famílias de DUBs também apresentarem papel semelhante no processamento dos precursores de Ub. A mais numerosa família de DUB/ULP cisteíno-proteases é a família USP, existindo mais de 50 USP em humanos. Ao contrário das UCH, as USP clivam grandes substratos, como cadeias de poliubiquitinas, na extremidade C-terminal da Ub (Nijman e cols, 2005).

Uma busca bioinformática por classes de DUB/ULP identificou a proteína Ataxina-3 e algumas proteínas semelhantes à ela (*Ataxina-3-like*) (Scheel e cols., 2003). Sua caracterização como uma família de DUB/ULP veio pouco tempo depois com experimentos de atividade *in vitro* (Burnett e cols., 2003). Mutações na Ataxina-3 causam a doença neurológica ataxia espinocerebelar tipo 3 ou doença de Machado-Joseph. Tais mutações levam a má formação e

agregação de proteínas e toxicidade celular. A ataxina-3 hidroliza seletivamente cadeias de poliubiquitinas K63 (Winborn e cols., 2008), através do reconhecimento por domínios UIM (do inglês, *ubiquitin interact motifs*). Com isso esta família de DUB/ULP foi nomeada MJD.

Abordagens bioinformáticas também levaram à identificação da família OTU (Makarova e cols., 2000). Diferente das outras cisteíno-proteases, a tríade catalítica desta família não é completa, possuindo apenas os resíduos de histidina e cisteína estabilizados por uma rede de ligações de hidrogênio (Nanao e cols., 2004).

As proteases com domínio JAMM fazem parte da classe das metalo-proteases. Em eucariotos, 3 proteínas com domínio JAMM possuem atividade DUB/ULP: a Rpn11, uma subunidade do proteassomo 26S que cliva cadeias de poliubiquitinas dos alvos protéicos a serem degradados (Yao e Cohen, 2002; Verma e cols., 2002); a CSN5, uma subunidade do COP9 signalossomo (uma montagem diferente do proteassomo) que cliva Nedd8 conjugada ao substrato protéico a ser degradado (Lyapina e cols., 2001); e a AMSH (do inglês, *associated molecule with the SH3 domain os STAM*), uma DUB/ULP envolvida na endocitose (McCullough e cols., 2004).

1.6.5 Fatores de extensão de cadeia (E4)

As enzimas E1, E2 e E3 costumam ser suficientes para a ubiquitinação. Contudo, foram descritos casos onde a presença de uma outra classe de fatores, E4, revelou-se essencial para a extensão das cadeias de Ub, mas não para a iniciação da mesma (Koege *et al.*, 1999). Há várias categorias de E4, segundo os domínios presentes nestas proteínas. As E4 constituem-se em fatores que favorecem a extensão de uma cadeia de Ub a partir de uma proteína monoubiquitinada (Hoppe, 2005). Para a atuação do fator E4, é necessária a reação dos componentes da via de ubiquitilação E1, E2 e E3.

A primeira família de E4 identificada foram as U-box, já mencionadas anteriormente, que se ligam aos substrato já ubiquitilados por uma a três Ub e então promovem a polimerização de mais Ub à cadeia. As U-box atuam como E3 (Hatakeyama e cols., 2001), como descrito anteriormente. Devido a este fator, existem tendências de definir as E4 como E3 especializadas, que

elongam cadeias de mono ou poliubiquitinas. Porém fatores como a incapacidade de algumas E4 de interagirem com E2 e estimular o processo de ubiquitilação e de não apresentar afinidade detectável com substratos do sistema (Koegl *et al.*, 1999) sugerem que tais proteínas podem ser uma nova classe de enzimas (Hoppe, 2005).

Existem ainda outras E4 que não possuem domínio U-box, como a p300 de humanos e o complexo BUL1-BUL2 (do inglês, *binds to ubiquitin ligase*) de leveduras. A p300 foi inicialmente descrita como cofator transcricional e acetiltransferase de histonas e, em sua função como E4, atua na proliferação celular (Kimbrel e Kung, 2009), regulação do ciclo celular, apoptose, diferenciação e resposta a dano no DNA (Iyer e cols., 2004), além de regulação da proteína supressora de tumor p53 (Grossman e cols., 2003). O complexo BUL1-BUL2 atua na facilitação da poliubiquitilação da proteína GAP1 em *S. cerevisiae*, o que gera um sinal para internalização pela via de distribuição vacuolar para o complexo *trans*-Golgi (Helliwell e cols., 2001).

1.7 Proteassomo

O proteassomo é o principal complexo proteolítico encontrado na maioria das células eucarióticas. Ele é responsável pela destruição de proteínas anormais, em excesso ou antigas, que podem ser tóxicas para as células. Também está envolvido na geração de peptídeos para a apresentação de antígenos através de moléculas MHC de classe I (Glickman e Ciechanover, 2002).

O complexo 20S (700 kDa) é o núcleo catalítico do proteassomo. Ele é composto de anéis heptaméricos de subunidades protéicas α e β que se associam sob a forma de um tubo cilíndrico. As subunidades β possuem atividade proteolítica, portanto, atuam diretamente na degradação das proteínas. O 20S pode ser encontrado livre nas células e, embora fosse considerado um forma latente do proteassomo, trabalhos recentes mostraram que este complexo pode estar envolvido na hidrólise de proteínas, em uma maneira independente de ATP (Asher e cols., 2005).

Geralmente o núcleo catalítico é encontrado acoplado à complexos regulatórios. Três complexos podem regular a atividade do 20S, ativando-o: 19S, 11S e o PA200. O complexo 19S, conhecido também como PA700, está envolvido no reconhecimento e degradação de proteínas ubiquitiladas, podendo também atuar de maneira independente de Ub (Glickman e Raveh, 2005). O complexo 11S, ou PA28, está envolvido na apresentação de antígenos via moléculas MHC de classe I (Rechsteiner e cols., 2000). Já o complexo PA200 parece estar envolvido no reparo de DNA e resposta a estresse (Ustrell e cols., 2002; Schmidt e cols., 2005). Existem ainda complexos que inibem a atividade do 20S, estes são: PI31 e Pr39 (McCutchen-Maloney e cols., 2000; Rechsteiner e Hill, 2005).

1.7.1 Sistema proteassomo-Ub (UPS)

O complexo 26S, em forma de barril, é formado pelo complexo regulatório (19S) e pelo núcleo catalítico (20S) (Figura 4). O complexo 19S é composto por subunidades ATPases da família AAA, que interagem com o núcleo catalítico, e por subunidades não ATPases, que parecem ser essenciais para o reconhecimento e processamento do substrato poliubiquitinado antes da degradação (Thrower e cols., 2000). Mais de dezessete unidades diferentes no complexo 19S organizam-se em uma tampa e uma base (Glickman e cols., 1998).

O sistema de degradação de proteínas mediado pelo proteassomo dependente de Ub e ATP (UPS) era, até pouco tempo atrás, considerado a principal via de degradação protéica em células eucarióticas. Porém, estudos recentes têm demonstrado o papel da ubiquitilação em inúmeros processos celulares que não envolvem a degradação via proteassomo, como já mencionado anteriormente, bem como a degradação de proteínas pelo proteassomo de forma independente de Ub, em proporções relativamente maiores que a degradação dependente de Ub (revisto por Jariel-Encontre e cols., 2008).

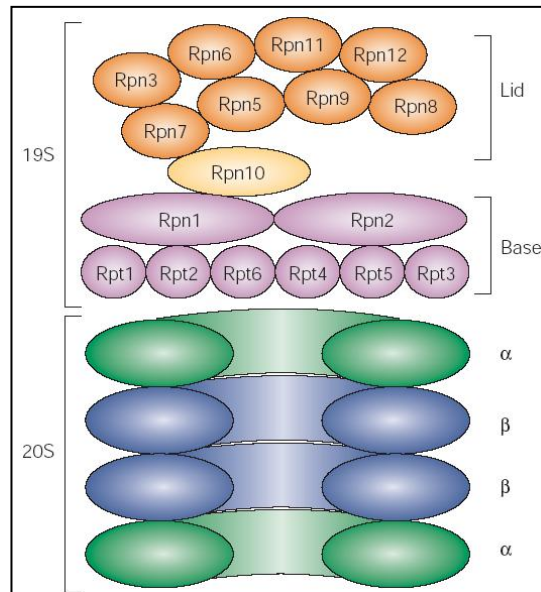


Figura 4. O proteassomo 26S.

Esta figura representa a composição do complexo 19S de *Saccharomyces cerevisiae*. Os anéis α e β do proteassomo 20S estão representados para mostrar como o complexo da base está ligado à estrutura central. Rpn: partícula regulatória não-ATPase, Rpt: partícula regulatória ATPase. Fonte: Pickart e Cohen, 2004

1.8 Domínios de ligação de ubiquitina

Como descrito anteriormente, a Ub pode ser conjugada ao substrato protéico como um monômero ou em cadeia de poliubiquitinas, e esta cadeia pode ser ligada através de diversos resíduos de lisina diferentes contidos na Ub. Além disso, existem as Ub-like que também são modificadoras de proteínas. Esses diferentes tipos de modificações geram sinais e funções diferentes que são reconhecidos e executados através de proteínas que contém motivos de ligação com Ub, que são frequentemente chamadas de receptores de Ub ou proteínas ligadoras de Ub (UBP – do inglês, *ubiquitin binding proteins*) (revisto por Hicke e cols., 2005).

As UBPs geralmente possuem um pequeno domínio de ligação com Ub (UBD – do inglês, *ubiquitin binding domain*) com aproximadamente 20 a 150 aminoácidos, que podem interagir tanto com mono ou poliubiquitilação. Os UBD não possuem o resíduo de lisina aceptor de Ub, e portanto formam uma interação não covalente com a modificação por Ub.

Os UBD podem ser encontrados nas enzimas envolvidas na ubiquitilação e de-ubiquitilação de proteínas, bem como em proteínas que reconhecem e interpretam o sinal da modificação.

O primeiro UBD caracterizado foi o da proteína Rpn10, uma subunidade do complexo regulatório 19S, conhecido como a tampa do proteassomo 26S, que foi então utilizado como ponto de partida para buscas bioinformáticas de UBD. A este domínio foi dado o nome de UIM (do inglês, *ubiquitin-interacting motif*) (Young e cols., 1998).

O domínio UBA (do inglês, *ubiquitin-associated*) é um domínio comum entre as enzimas envolvidas na ubiquitilação e de-ubiquitilação de proteínas. Foi encontrado por análises bioinformáticas comparando as sequências dessas enzimas (Hofmann e Bucher, 1996). Com a descoberta dos domínios UIM e UBA, criou-se grande interesse no estudo dos UBD, principalmente pois eram encontrados em diversas proteínas que não apresentavam envolvimento direto com o sistema de ubiquitilação, indicando que estas proteínas seriam receptores do sinal gerado pela ubiquitilação.

Em seguida diversos esforços foram tomados para a identificação de UBDs. Pelo menos 17 UBD já foram descritos: **CUE** (do inglês, *Coupling of Ubiquitin conjugation to Endoplasmic reticulum degradation*) (Donaldson e cols., 2003), **GAT** (**G**ga e **TOM1**) (Shiba e cols., 2004), **VHS** (**V**ps27, **H**RS, **S**TAM) (Mizuno e cols., 2003), **GLUE** (do inglês, *GRAM-Like Ubiquitin-binding in Eap45*) (Slagsvold e cols., 2005), **PAZ/ZnfUBP** (do inglês, *Poliubiquitin-Associated Zinc finger*) (Hook e cols., 2002), **NZF** (**N**pl4 **Z**inc **F**inger) (Meyer e cols., 2002), **A20 ZnF** (Wertz e cols., 2004), **UBZ** (do inglês, *Ubiquitin-Binding ZnF*) (Bienko e cols., 2005), **Ubc** (do inglês, *Ubiquitin-Conjugating enzyme*) (Pickart, 2001), **UEV** (do inglês, *Ubiquitin-conjugating Enzyme Variant*, domínio semelhante ao domínio catalítico das E2 porém não possui o sítio ativo de cisteína) (Pornillos e cols., 2002), **DUIM** (do inglês, *Double-sidedUIM*) (Lee e cols., 2006), **MIU** (do inglês, *Motif Interacting with Ubiquitin*) (Hirano e cols., 2006), **UBM** (do inglês, *Ubiquitin-Binding Motif*) (Bienko e cols., 2005), **Jab1/MPN** (Bellare e cols., 2006), **PFU** (do inglês, *PLAA Family Ubiquitin binding*) (Mullally e cols., 2006).

Outra característica das UBP é a capacidade de serem ubiquitiladas através de um processo que necessita da integridade do UBD, este processo é

conhecido como ubiquitilação acoplada (*coupled ubiquitilation*), e geralmente é realizada como monoubiquitilação (revisto por Hicke e cols., 2005). Woelk e colaboradores descreveram em 2006 que o mecanismo de ubiquitilação acoplada da proteína eps15, uma proteína que possui o domínio UIM, depende do reconhecimento da mesma por uma E3 ubiquitilada, ou pela E3 parkina, que possui um domínio de Ub, como já descrito anteriormente (Woelk e cols., 2006).

1.9 Ubiquitilação em tripanossomatídeos

A ubiquitina, como já mencionado anteriormente é uma das proteínas mais conservadas em eucariotos, diferindo entre humanos e *T. cruzi* em apenas 3 aminoácidos (Fig. 5). Apesar de existir esta conservação entre os genes codificadores de Ub, a organização destes no genoma de cada organismo é diferente, sendo observadas diversidades interespecies no número e tamanho dos genes de Ub.

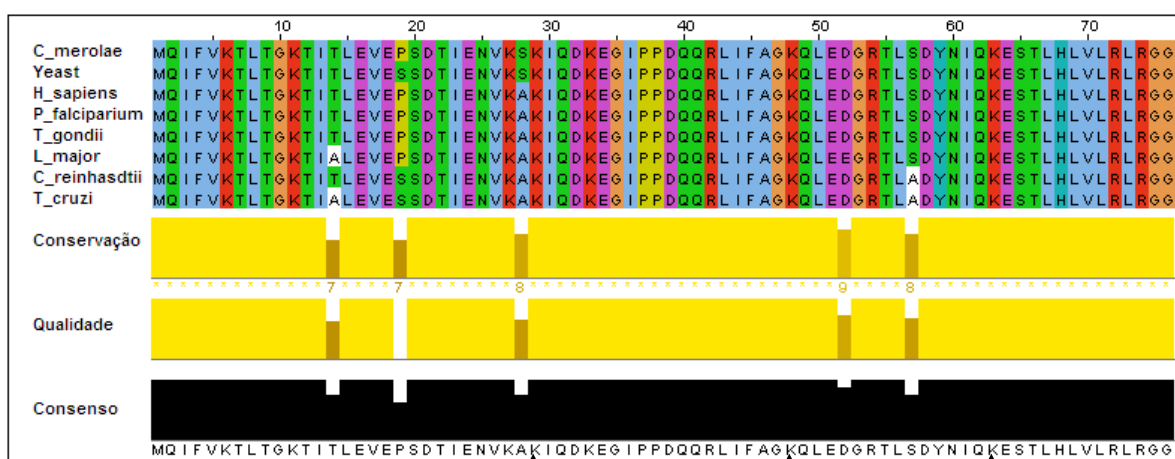


Figura 5. Alinhamento múltiplo da sequência de Ub de diferentes eucariotos, representando os 3 aminoácidos distintos entre *T. cruzi* e *Homo sapiens* nas posições 14, 19 e 57. As cabeças de seta apontam as lisinas K29, K48 e K63, geralmente usadas na polimerização de Ub. O alinhamento foi visualizado com o auxílio do programa JalView (<http://www.jalview.org>) (Clamp e cols., 2004).

Em *T. cruzi* existem 5 genes de poliubiquitina (PUB) e 5 genes de fusão (FUS), os quais somam aproximadamente 100 unidades de domínios Ub. Os genes FUS codificam para uma Ub na extremidade N-terminal fusionada a um

domínio C-terminal de 52 aminoácidos (Swindle e cols., 1988; Kirchhoff e cols., 1988). A predição da sequência aminoacética deste gene de 52 aminoácidos não codificador de Ub mostrou tratar-se de um motivo potencialmente ligador de metais e ácidos nucleicos, motivo este que foi encontrado em um fator de transcrição de *Xenopus laevis* (Miller e cols., 1985). Pouco tempo depois Baker e Board publicaram um trabalho comparando este domínio com uma subunidade ribossomal (Baker e Board, 1991). Os genes PUB consistem de repetições, de número variado, da sequência codificadora de Ub, seguido por um gene FUS. Curiosamente tais genes (PUB e FUS) são diferencialmente expressos em resposta a diferentes estímulos ambientais: células de *T. cruzi* em fase estacionária de crescimento têm a transcrição do gene PUB aumentada enquanto que a do gene FUS está diminuída (Swindle e cols., 1988).

Posteriormente caracterizações da organização dos genes de Ub em *T. cruzi* descreveram a ligação dos genes de Ub à genes codificadores de calmodulina (Chung e Swindle, 1990). A calmodulina é outra proteína altamente conservada entre os eucariotos que, assim como a Ub, regula a atividade de diversas proteínas, mas através de sua ligação ao cálcio (revisto por Means, 2008). O gene CUB (do inglês: *calmodulin-ubiquitin associated*), de função desconhecida, liga os genes de calmodulina e Ub (Ajioka e Swindle, 1993) e foi visto como sendo um gene essencial para a viabilidade do *T. cruzi* (Ajioka e Swindle, 1996) e para a virulência do mesmo (Barrio e cols., 2007).

A via de ubiquitilação, apesar de ser bem conhecida em eucariotos, em *T. cruzi* ainda não foi caracterizada. Um dos primeiros trabalhos realizados visando elucidar os mecanismos de degradação protéica em *T. cruzi* demonstrou que existia o envolvimento do sistema de ubiquitilação na degradação não lisossomal de proteínas em condições de estresse nutricional (Henriquez e cols., 1993).

Trabalhos mais recentes reconhecem o envolvimento do processo de degradação por proteassomo dependente de Ub na diferenciação de formas tripomastigotas metacíclicas → amastigotas → tripomastigotas sanguíneos cultivados *in vitro* (De Diego, e cols., 2001; Gonzalez e cols., 1996), bem como na diferenciação de epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos (Cardoso e cols., 2008).

O envolvimento da ubiquitilação na internalização de proteínas de membrana foi relatado no tripanosomatídeo *T. brucei*, especulando uma provável função na endocitose através de ubiquitilação de ectofosfatases de membrana (Steverding, 2006) e internalização da glicoproteína de superfície invariante (ISG)65 através do envolvimento de ubiquitilação e de clatrina (Chung e cols., 2008).

Além disso, o repertório das enzimas envolvidas no processo de ubiquitilação em *T. cruzi* já é parcialmente conhecido através de estudos não publicados realizados por nosso grupo no ICC. Através da busca por domínios relacionados ao sistema de ubiquitilação foram encontrados em *T. cruzi* 7 enzimas E1, 26 E2 e 79 E3. Em *T. brucei* a busca resultou em 4 enzimas E1, 15 E2, 51 E3, e em *L. major* 4 enzimas E1, 14 E2 e 56 E3.

Porém, a atuação e caracterização desse sistema, bem como a atividade de seus elementos ainda não são bem entendidas neste eucarioto primitivo. Tais informações são de extrema importância, uma vez que seu pleno entendimento poderia contribuir para preencher lacunas existentes na compreensão de como ocorre a diferenciação em *T. cruzi*, e qual o papel desse sistema proteolítico no disparo da metaciclogênese.

A via proteassomo-Ub pode ser de grande importância na diferenciação do *T. cruzi*, pois acredita-se ser um dos principais processos mantenedores do equilíbrio síntese X degradação de proteínas estágio específicas. Do mesmo modo, como já mencionadas anteriormente, novas descobertas demonstram o envolvimento da ubiquitilação não apenas na degradação protéica, mas em inúmeras modificações pós-traducionais em proteínas chaves de diversos processos celulares, fato que tem estimulado os estudos sobre o papel dessa via em diversos organismos modelos e doenças.

2. OBJETIVOS

Neste contexto, o objetivo geral do presente trabalho é identificar proteínas que possuem interação com a Ub e prováveis domínios de ligação de Ub existentes nestas proteínas identificadas, bem como identificar as proteínas ubiquitiladas. Com isso será possível identificar os prováveis moduladores e/ou receptores da sinalização gerada pela ubiquitilação, permitindo investigar o papel desta via de modificação protéica na regulação de vias metabólicas e na diferenciação do *T. cruzi*, além de gerar informações importantes sobre o mecanismo de regulação da expressão gênica nestes eucariotos primitivos, que é essencialmente pós-transcricional.

Os objetivos específicos estabelecidos para alcançar o objetivo geral proposto no presente trabalho estão listados abaixo:

- Amplificar e clonar a sequência de nucleotídeos correspondente ao gene codificador de Ub nos vetores selecionados para expressão heteróloga em bactérias e de expressão em *T. cruzi*.
- Produzir anticorpos contra Ub recombinante obtida em *Escherichia coli*.
- Enriquecer extrato de proteínas ubiquitiladas e de interação com Ub de extrato de proteínas totais de *T. cruzi*.
- Identificar as proteínas obtidas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia escolhida para identificar as proteínas de interação com a ubiquitina em *T. cruzi* é a cromatografia de afinidade à ubiquitina. Desta forma, as proteínas que possuírem maior afinidade à ubiquitina podem ser isoladas e então identificadas. Já para identificar os alvos protéicos desse processo no parasita, a metodologia aplicada utilizou vetores para expressão em *T. cruzi*, como ferramenta de expressão de Ub fusionadas a diferentes etiquetas moleculares (histidinas e tap-tag), bem como anticorpos para Ub. Tais ferramentas possibilitam o enriquecimento de proteínas modificadas pela Ub através de processos de purificação por cromatografia de afinidade à etiquetas moleculares diferentes.

3.1 Materiais e Procedência

Amersham-Parmacia Biotech

- Anti-histidina
- Anti-IgG de camundongo
- *CNBr-activated Sepharose 4 Fast Flow*
- *EcoRV*
- *Hybond N+*,
- Hyperfilm™ ECL
- *Taq* DNA polimerase
- *ECL detection kit*

Appligene

- IPTG

Biochemika

- TFA

Bio Rad

- Acrilamida
- Agarose
- Azul de bromofenol
- Bis-acrilamida
- Persulfato de amônia

Cult-lab

- Soro fetal bovino

Difco

- Bacto-triptona
- Extrato de levedura
- Infuso de fígado
- triptose

Invitrogen

- EDTA
- Fenol
- Gateway® BP Clonase™ II
- Gateway® LR Clonase™
- Gateway® pDEST™ 17
- Gateway® pDONR™ 221
- kit PCR Platinum® Pfx

MERCK

- Acetato de sódio
- Ácido acético
- Ácido clorídrico
- TCA
- Álcool isoamílico
- Bicarbonato de Sódio
- Carbonato de Sódio

- Cloreto de magnésio
- Cloreto de potássio
- Cloreto de sódio
- Clorofórmio
- Etanol absoluto
- Fosfato diabásico de sódio
- glucose
- Hidróxido de sódio
- SDS
- Sulfato de magnésio

Microbiológica

- Hemina

Millipore

- Colunas Centricon 50 - *Amicon Centricon filters* MW cut-off 50 kDa
- Colunas Microcon 30 – *microcon[®] Amicon Bioseparations*

New England Biolabs

- *BamH, HindIII, SpeI, SphI, EcoRI*
- *DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment*
- Tampões para as enzimas de restrição

Promega

- *T4 DNA Polymerase*
- Tripsina

Pierce

- *Micro BCA Protein Assay*

Qiagen

- *QIA filter plasmid mini kit*
- *QIA filter plasmid mid kit*

- NiNTA-Agarose

Roche Molecular Biochemicals

- *High pure PCR product purification kit*
- Enzima de restrição SacI

Sigma

- Amberlit
- Ampicilina
- β -mercaptetanol
- brometo de etídio
- BSA
- Cloreto de cálcio
- DMSO
- Ferricianato de potássio
- Ficoll
- Formaldeído
- Glicerol
- Hepes
- IAA
- Nitrato de Prata
- Nonidet P-40 (NP-40)
- Ponceau S
- Resina proteína G sepharose
- TEMED
- Tetraciclina

USB Corporation

- DTT
- Persulfato de amônio
- *T4 DNA Ligase*
- Tris
- Uréia

VETEC

- Bicarbonato de amônio

Whatman

- Papel 3MM
- Membrana de nitrocelulose

3.2 Meios de Cultura

Meio LB: Bacto-triptona 10 g/l; Extrato de levedura 5 g/l; NaCl 5 g/l

Meio LB agar: Meio LB suplementado com 15 g/l de agar

Meio LIT (*liver infusion tryptose*): Extrato de levedura 15 g/l; Fosfato dibásico de sódio 11,56 g/l; Glucose 2,2 g/l; Hemina 0,02 g/l; Infuso de fígado 5 g/l; KCl 0,4 g/l; NaCl 4,4 g/l; Soro fetal bovino 10%; Triptose 5 g/l pH 7,2

Meio TAU (*triatomine artificial urine*): CaCl_2 2 mM; KCl 17 mM; MgCl_2 2 mM; NaCl 190 mM; Tampão fosfato pH 6,0 8 mM

3.3 Soluções e Tampões

Azul de Coomassie: Azul de Coomassie R-250 0,1%; Metanol 45%; Ácido Acético 10%

Fenol/Clorofórmio: 25 partes de fenol saturado; 24 partes de clorofórmio; 1 parte de álcool isoamílico

PBS 10x: 0,137 M NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$; 1,5 mM KH_2PO_4

Ponceau S: Ácido Acético 1%; Ponceau S 0,5%

Tampão de acoplamento: 0,1 M NaHCO₃ pH8.0; 0,5 M NaCl

Tampão de amostra de proteína 4x (T.A.4X): 0,16 M Tris-HCl pH 6.8; SDS 4%; β-mercaptoetanol 10%; Glicerol 24%; Azul de bromofenol 0,02%

Tampão de amostra de DNA: Azul de bromofenol 0,25%; ficoll 400 25%; xileno cianol 0,25%, TBE 1X

Tampão de eletroforese para SDS-PAGE 1X: 25 mM Tris-base; 0,192 M Glicina; SDS 0,1%

Tampão de eletroporação: 140 mM NaCl; 25 mM Hepes ácido; 0,74 mM Na₂HPO₄

Tampão de eluição C: 10 mM Tris pH8.0; 150 mM NaCl; 01% NP-40, 10 mM β-mercaptoetanol, 1 mM Acetato de magnésio; 1 mM Imidazol; 40 mM EGTA

Tampão de eluição com Imidazol: 0,1 M NaH₂PO₄; 0,3 M NaCl; 0,1 M a 0,3 M Imidazol

Tampão de estocagem de células cálcio competentes: 100 mM CaCl₂; 10 mM Hepes pH7.0; Glicerol 10%.

Tampão de lavagem com Imidazol: 0,1 M NaH₂PO₄; 0,3 M NaCl; 0,02 M a 0,06 M Imidazol

Tampão de lavagem para afinidade: 0,02 M Tris-HCl pH8.0; 0,3 M a 1 M NaCl; 10% Glicerol; 0,1% NP-40

Tampão de lavagem de imunoafinidade: 100 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 10 mM Hepes pH 7.0; NP-40 1%; 1 mM PMSF; 10 μM E-64

Tampão de ligação C: 10 mM Tris pH8.0; 150 mM NaCl; 0,1% NP-40; 1 mM Acetato de Magnésio; 1 mM Imidazol; 4 mM CaCl₂

Tampão de ligação IgG: 10 mM Tris pH8.0; 150 mM NaCl; 0,1% NP-40

Tampão de lise de bactérias: 0,02 M Tris-HCl pH8.0; 2% Triton X-100; 0,5 M NaCl; 1 mM PMSF; 10 μ M E-64

Tampão de lise desnaturante I: 7 M Uréia; 2 M Thiourea; 40 mM Tris-base; 1 mM PMSF; 10 μ M E-64

Tampão de lise desnaturante: 0,02 M Tris-HCl pH8.0; 0,01 M MgSO_4 ; 1 mM CaCl_2 ; 1% SDS; 0,01 M β -mercaptoetanol; 1 mM PMSF; 10 μ M E-64; 0,01 M Iodoacetamida

Tampão de lise não desnaturante: 0,02 M Tris-HCl pH8.0; 0,3 M NaCl; 10% Glicerol; 0,1% NP-40; 1 mM PMSF; 10 μ M E-64

Tampão de lise para TAP-tag: 0,1 M KCl; 5 mM MgCl_2 ; 17% Glicerol; 0,5% NP-40; 10 mM Tris pH8.0; 1 mM EDTA; 10 mM NEM; 0,5 mM DTT; 1 mM PMSF; 10 μ M E64

Tampão de preparo de células cálcio competentes: 100 mM CaCl_2 ; 10 mM Hepes pH 7.0

Tampão de revelação de Western: 0,1 M Tris-HCl pH 9.5; 0,1 M NaCl; 5 mM MgCl_2

Tampão de solubilização: 0,1 M NaH_2PO_4 ; 0,3 M NaCl; 10 mM Imidazol e 8 M Uréia

Tampão para transferência 1X: 25 mM Tris-base; 192 mM Glicina; Metanol 20%

Tampão TE: 10 mM Tris-HCl pH 8.0; 1 mM EDTA pH 8.0

Tampão TEV: 10 mM Tris pH8.0; 150 mM NaCl; 0,1% NP-40; 0,5 mM EDTA; 1 mM DTT

TBE 1X: 89 mM Tris-base; 89 mM Ácido bórico; 2 mM EDTA pH8.0

Solução de fixação de SDS-PAGE: Etanol 50%; Ácido Acético 12%; Formaldeído 0,02%

Solução de coloração por prata: Nitrato de prata 0,2%; Formaldeído 0,03%

Solução de Descoloração de SDS-PAGE: Metanol 4%; Ácido Acético 7,5%

Solução de revelação de prata: Carbonato de Sódio 3%; Formaldeído 0,02%; 2 ml de solução de sensibilização

Solução de sensibilização para coloração por prata: Tiosulfato de Sódio 0,02%

Solução de término de revelação de prata: Etanol 50%; Ácido Acético 12%

3.4 Organismos

Escherichia coli

Linhagens: BL21(DE3)pLysE; DH5α e XL1-Blue

Trypanosoma cruzi

Clone: Dm28c em diferentes fases da metaciclogênese (epimastigotas, epimastigotas estressados e tripomastigotas metacíclicos).

Mus musculus

Fêmeas de linhagem Swiss

3.5 Vetores plasmidiais

3.5.1 Para clonagem e expressão em *E. coli*

A clonagem e expressão foram realizadas de acordo com a tecnologia *Gateway*[®] (INVITROGEN), a qual utiliza métodos baseados na recombinação sítio-específica existente em bacteriófagos lambda (Landy, 1989). Para a clonagem foram utilizados um vetor de entrada, pDONRTM221, e um vetor de expressão, pDESTTM17 (Figura 6).

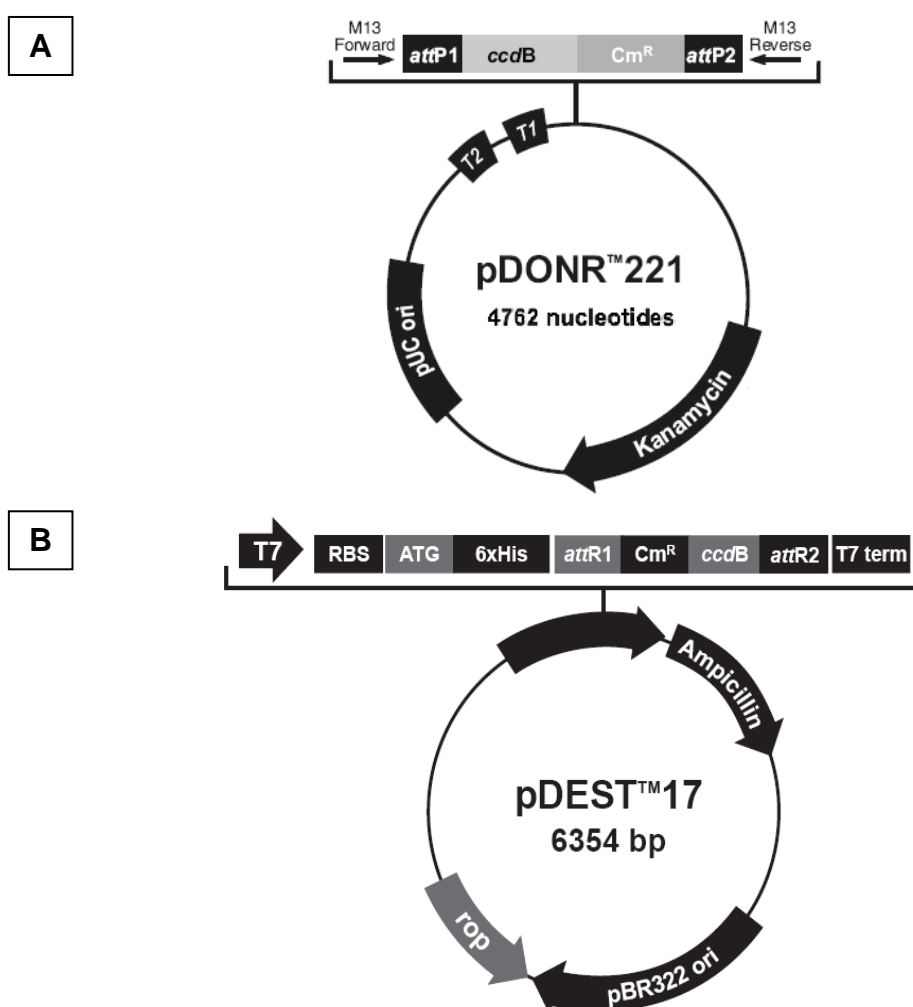


Figura 6. Desenho dos vetores de clonagem e expressão em *E. coli*.

A) pDONRTM221 - Em destaque o sítio RFA de inserção do gene com os adaptadores attP1 e attP2 que permitem a recombinação com os adaptadores attBtev e attB2 do gene. B) pDESTTM17 - destacando as principais características do vetor, como o promotor T7, a sequência codificadora de 6 histidinas, sítios attR de recombinação com os sítios attL dos clones de entrada, gene de seleção ccdB. Fonte: Catálogo Gateway[®] Technology Invitrogen (2006)

3.5.2 Para expressão em *T. cruzi*

Foram selecionados vetores com estratégias diferentes de expressão em *T. cruzi*: pTEX (KELLY e cols.,1992), pTEXp, pBEX, pTcPR-HisN e pTcPR-TAP (Figura 7). Os vetores pTcPR-TAP, pTcPR-HisN e pBEX são derivados do pBluescript II KS+ (*Stratagene*) e foram construídos por equipes do Instituto Carlos Chagas (ICC), bem como o vetor pTEXp, que é derivado do vetor pTEX.

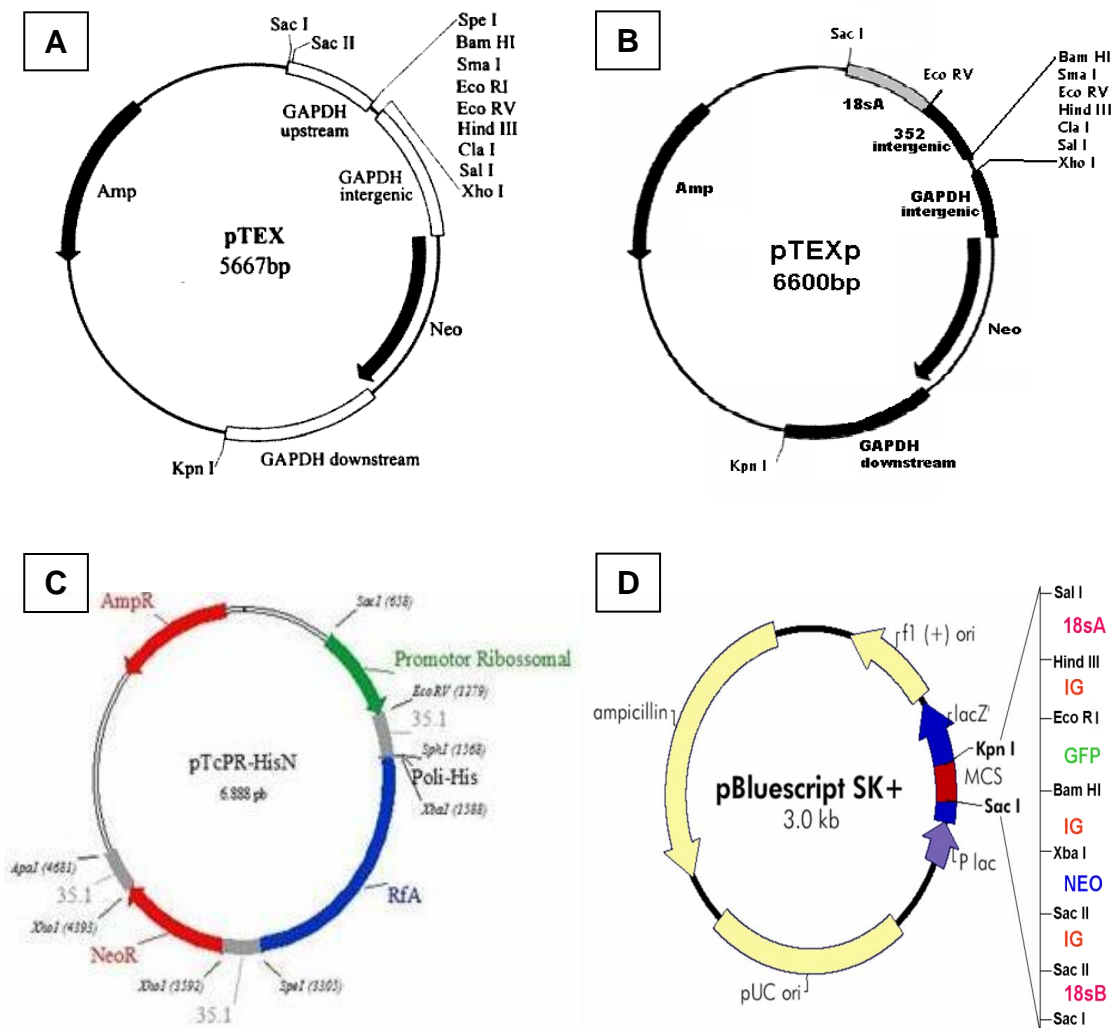


Figura 7. Desenho dos vetores de expressão em *T. cruzi*.

Vetores epissemiais: A – pTEX; B – pTEXp; C – pTcPR-HisN (o vetor pTcPR-TAP não está representado na figura, mas é semelhante ao pTcPR-HisN, diferindo apenas na etiqueta, que neste caso possui etiqueta para purificação por TAP-tag). Vetor de integração: D – pBEX. Ambos os vetores possuem o gene de resistência a Neomicina (G418).

Os vetores episomais pTcPR-TAP e pTcPR-HisN foram construídos de acordo com a plataforma de clonagem *Gateway®* (*Invitrogen*). Para a entrada do gene de trabalho nessa plataforma é necessária a inclusão do mesmo em um vetor de entrada. O pDONR221 foi utilizado para tal finalidade. O pTcPR-TAP possui a etiqueta para purificação por afinidade em série (TAP-tag, do inglês, *Tandem Affinity Purification*) (Rigaut e cols., 1999; Puig e cols., 2002), já o pTcPR-HisN possui uma etiqueta de 6 histidinas para purificação por afinidade ao níquel.

O pBEX é um vetor de integração ao genoma do organismo.

O pTEXp é um vetor episomal derivado do pTEX que difere do mesmo por apresentar um promotor ribossomal 18s de *T. cruzi*, gerando uma maior expressão do inserto. Esta modificação foi realizada pela nossa equipe no ICC.

Para a inserção deste promotor neste vetor, foi utilizado o promotor ribossomal 18s do clone Dm28c de *T. cruzi* como molde. Este promotor foi retirado de um cassete nomeado GSDm28c (gene sintético promotor ribossomal p18sDm28c de *T. cruzi*) que possui uma região intergênica, chamada 352, para possibilitar o *trans-splicing* do RNA da proteína clonada. Ambos promotor e região intergênica foram retirados do cassete por digestão enzimática, uma vez que esta região é flanqueada pelos sítios para as endonucleases de restrição *Sac I* (no início do promotor) e *Sph I* (no final da intergênica), e depois inseridos no pTEX.

Inicialmente 3 µg do pTEX foi digerido por 1 hora a 37 °C com 10 unidades da endonuclease de restrição *Spe I* (*NEB*), repetindo este processo mais duas vezes, acrescentando 10 unidades da enzima a cada repetição. O produto da digestão do pTEX foi purificado com fenol/clorofórmio e precipitado com etanol absoluto e acetato de sódio. Após a digestão e purificação, foi realizada uma correção das extremidades digeridas com a enzima *DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment* (*NEB*) a qual corrige as projeções formadas pela endonuclease na extremidade 5' (5' *overhangs*), gerando extremidade não coesiva (*blunt end*). Para tanto, todo o produto da digestão foi incubado por 15 minutos a 25 °C com 33 µM de dNTP e 5 unidades da enzima. A reação foi parada adicionando 10 mM de EDTA e incubando por 20 minutos à 75 °C. Em seguida o pTEX digerido e corrigido foi submetido à uma nova digestão com 40 unidades da enzima *Sac I* (*NEB*), a digestão foi realizada

durante a noite (aproximadamente 16 horas) a 37 °C. Quando digere-se o vetor pTEX com estas duas enzimas (*Spe I* e *Sac I*) um fragmento de aproximadamente 500 pares de base (pb), correspondente a região intergênica GAPDH *upstream*, é liberado, podendo ser observado por eletroforese em gel de Agarose, comprovando a digestão.

Para a obtenção do fragmento de aproximadamente 900 pb correspondente ao promotor 18s e intergênica 352, o cassete GSDm28c foi digerido inicialmente com 20 unidades da enzima *Sph I* (*NEB*) durante a noite a 37 °C. Esta digestão também foi corrigida, desta vez com a enzima *T4 DNA Polymerase* (*Promega*) que corrige as projeções formadas pela endonuclease na extremidade 3' (3' *overhangs*), também produzindo extremidade não coesiva (*blunt end*) para poder ligar com a extremidade semelhante formada no pTEX. Do mesmo modo foi acrescentado à reação 33 µM de dNTP e 15 unidades da enzima, a reação foi incubada por 5 minutos a 37 °C. A reação foi finalizada inativando a enzima à 75 °C por 10 minutos. O fragmento foi então digerido com 40 unidades da endonuclease de restrição *Sac I* (*NEB*), que forma uma projeção coesiva que pode ser ligada ao pTEX.

A ligação entre o fragmento promotor/intergênica e o vetor pTEX é catalisada pela enzima *T4 DNA Ligase* (*USB Corporation*). Aproximadamente 50 ng do vetor pTEX digerido foram incubados com 50 ng do promotor/intergênica e 400 unidades da enzima por aproximadamente 16 horas à 16 °C. O resultado da ligação foi nomeado pTEXp (pTEX promotor).

3.6 Extração de DNA genômico de *T. cruzi*

A extração e purificação das moléculas de DNA foi realizada segundo Fragosó e Goldenberg (1992). Assim, 1×10^{10} células foram lavadas em tampão NKM e lisadas segundo Chomczynski (1987), para ter os núcleos celulares parcialmente purificados foi necessário três ciclos de centrifugação a 800 x g, por 10 minutos, a 4 °C. Esta fração foi incubada em EDTA 5 mM, NaCl 10 mM, proteinase K 100 µg/ml, SDS 0,5 % e Tris-HCl pH 7,6 10 mM, por 12 horas, a 37 °C. O DNA foi extraído com fenol saturado em tris-base 100 mM e

purificado em várias diálises em EDTA 1 mM, NaCl 100 mM e tris-HCl pH 7,6 10 mM.

3.7 Eletroforese de DNA

As eletroforeses de DNA foram realizadas em géis de agarose horizontal conforme descrito por SAMBROOK *et al.* (1989). As amostras foram diluídas em tampão de amostra de DNA e aplicadas em gel de agarose com concentração variada, também o padrão de massa molecular foi aplicado no gel (1 Kb Plus – *Invitrogen*). Os géis de agarose foram preparados em tampão TBE 1X, nas concentrações de 1% e 1,5% (m/v) e a corrida eletroforética foi realizada no mesmo tampão, a 80 V durante tempo variável. O DNA foi corado com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta em transiluminador e o perfil eletroforético foi registrado em um sistema de vídeo documentação.

3.8 Desenho de iniciadores e amplificação

Foram desenhados iniciadores direto e reverso para amplificação da sequencia correspondente ao genes da Ub de *T. cruzi*, com o auxílio do programa *Primer Select* (*Laser Gene, DNA Star*), usando como base a seqüência deste gene disponível no banco de dados do GeneDB (*The Welcome Trust Sanger Institute*). À extremidade de cada iniciador foi acrescentada uma seqüência de nucleotídeos correspondente aos sítios para endonucleases de restrição específicas para clonagem nos diferentes vetores de expressão em *T. cruzi* selecionados. Já para clonagem e expressão em *E. coli* foram acrescentadas as seqüências correspondentes aos sítios attB (Tabela 2) nas extremidades dos iniciadores para inserção das seqüências na plataforma *Gateway*® de clonagem.

INICIADORES	SEQUENCIA
<u>attB1</u> Direto	5' <u>G G G G A C A A G T T T G T A C A A A A A G C A G G C T T C A T G</u> ... 3'
<u>attB2</u> Reverso	5' <u>G G G G A C C A C T T T G T A C A A G A A G C T G G G T C C</u> TTA ... 3'

Tabela 2: Seqüências adaptadoras:

attb1, que é inserida na extremidade do iniciador direto, e a attb2 que é inserida na extremidade do iniciador reverso. Os 3 pontos são referentes à seqüência inicial (direto) e terminal (reverso) do gene a ser clonado. O códon de parada (destacado em vermelho) foi acrescentado ao final da seqüência codificadora da proteína recombinante.

O gene da Ub foi amplificado a partir do DNA genômico de *T. cruzi*, clone Dm28c, com o auxílio do *kit PCR Platinum® Pfx* (INVITROGEN), o qual utiliza uma DNA polimerase proveniente de *Thermococcus sp.* de linhagem KDO (TAKAGI *et al.*, 1997; NISHIOKA *et al.*, 2001), chamada *Platinum® Pfx DNA Polymerase*. Esta é uma enzima de alta fidelidade que minimiza os erros de polimerização, possibilitando melhores resultados. A mistura para a reação continha, em um volume final de 20 µl, 10 pmol dos iniciadores direto e reverso, 0,3 mM dos quatro desoxirribonucleotídeos (dNTP), 1 mM de MgSO₄, 5ng de DNA genômico de *T. cruzi* Dm28c e 1 unidade de *Platinum® Pfx DNA* polimerase, em tampão *Pfx 1X*, as mesmas concentrações de reação foram utilizadas para todos os iniciadores. As reações foram submetidas a 35 ciclos de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase): desnaturação – 94 °C, 15 segundos –, hibridação dos iniciadores – 55 °C, 30 segundos – e polimerização – 68 °C, 1 minuto. Antes do primeiro ciclo, as reações foram mantidas a 94 °C, por 3 minutos.

O resultado da amplificação foi verificado em gel de Agarose 1,5%.

3.9 Purificação de produtos de amplificação

A purificação dos produtos de amplificação é realizada tanto para eliminar possíveis seqüências amplificadas inespecificamente e que não são de interesse para o trabalho, quanto para remover os iniciadores que contém os sítios de recombinação attB, e que são fortes competidores pelo sítio attP do vetor, dificultando a clonagem dos insertos.

A metodologia de purificação escolhida foi a purificação em gel: 10% do produto de amplificação é aplicado em uma canaleta do gel de agarose 2% e

todo o produto restante é aplicado em outra canaleta do mesmo gel, colocando o marcador de massa molecular ao lado da canaleta com 10% da amostra. O gel é submetido a eletroforese e, então, a parte do gel que possui 10% do produto de amplificação é cortado do restante do gel, juntamente com o marcador de massa molecular, corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta em transiluminador. Assim, é possível visualizar a banda de interesse e marcar o gel na posição em que ela se encontra. Em seguida, este gel marcado é disposto ao lado do restante do gel que não foi corado com brometo de etídeo e, com base na marcação realizada no gel corado, pode-se cortar o pedaço do gel no qual o fragmento de interesse se encontra, evitando contaminá-lo com brometo de etídeo e expô-lo a UV.

Em seguida, a banda excisada do gel foi colocada no interior de uma ponteira de 1000 mL com filtro, a qual foi encaixada em um tubo eppendorf. A seguir, este tubo foi centrifugado a 6000 x g por 5 minutos. Do material deste modo obtido, o fragmento de DNA foi precipitado acrescentando acetato de sódio 3 M na proporção 1:10 (1 parte de acetato de sódio para 10 partes de produto da purificação), etanol 100% na proporção 3:1 e 1 µl de glicogênio. A solução foi homogeneizada e incubada por 20 minutos no gelo seco ou durante a noite a -20° C. Foi centrifugada por 20 minutos a 14000 x g, lavada 2 vezes com etanol 70% e o precipitado foi seco a 50° C para evaporar os resíduos de etanol, então o fragmento de DNA purificado foi ressuspensão em 10 µl de água ultrapura.

3.10 Transformação de bactérias cálcio competentes

3.10.1 Preparo de células cálcio competentes

Uma colônia de *E. coli* da cepa desejada foi inoculada em 5.0 mL de meio LB contendo antibiótico apropriado para cada cepa. A cultura foi incubada a 37 °C por 18 horas sob agitação constante. Um volume de 1.0 mL (inóculo de 1:100) desta cultura foi transferido para 100 mL de meio LB e a mesma foi incubada a 37 °C sob agitação constante até o início da fase de crescimento exponencial (densidade ótica₆₀₀ de 0.4 a 0.6, aproximadamente 3 horas).

Após o crescimento, as células foram resfriadas no gelo por 15 minutos. A partir desse ponto todas as etapas foram feitas a 4 °C. A cultura foi centrifugada a 4000 x g, por 5 minutos, a 4 °C, e as células foram ressuspensas em 50 mL (metade do volume da cultura original) de tampão de preparo de células cálcio competentes gelado e estéril e mantidas no gelo durante 30 minutos para então serem submetidas à uma centrifugação nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 2.0 mL (1/50 do volume da cultura original) de tampão de estocagem de células cálcio competentes. As células foram aliquotadas e estocadas a -70 °C.

3.10.2 Transformação por choque térmico

Aproximadamente 100 µl de células cálcio competentes foram incubadas com aproximadamente 50 ng dos plasmídeos purificados por 30 minutos em gelo. Logo depois, foi realizado choque térmico – 3 minutos a 42 °C e 3 minutos no gelo. Após a realização da transformação, as células foram incubadas em meio LB, por 1 hora a 37 °C sob agitação de 220 rpm, e inoculadas em 5 ml de meio LB com antibiótico apropriado para seleção ou plaqueadas em meio LB agar também com antibiótico para seleção. A cultura líquida foi incubada sob agitação (220 rpm) a 37 °C durante a noite (16 horas) e a cultura em placa foi incubada da mesma forma, porém sem agitação.

3.11 Clonagem

A clonagem do fragmento correspondente ao gene de Ub na Plataforma Gateway® foi possível através da recombinação entre os sítios attB do produto da amplificação e attP do vetor pDONR221 (INVITROGEN) com o auxílio do *mix* enzimático *BP Clonase*TMII (INVITROGEN) originando um sítio attL. Para tanto, 9 ng do produto de PCR previamente purificados foram incubados com 150 ng do vetor pDONR221 e com a *BP Clonase* por 7 horas a 25 °C, diluído em tampão TE pH8.0. A reação foi parada com a adição de Proteinase K.

Bactérias *E. coli* cálcio competentes de linhagem DH5α foram transformadas com os plasmídeos recombinados a fim de propagá-los. Os plasmídeos clonados foram purificados utilizando o kit *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN), conforme recomendações do fabricante.

O inserto foi transferido para os vetores pDEST17 (INVITROGEN), pTcPR-HisN e pTcPR-TAP, com o auxílio do *mix* enzimático *LR Clonase*TM II (INVITROGEN), através dos sítios attL do clone de entrada e attR dos vetores de destino. A recombinação foi obtida através da incubação de 150 ng do clone em vetor de entrada, 150 ng de vetor de destino, tampão TE pH 8.0 e *LR Clonase*TM II por 12 horas a 25 °C. Após incubação foi acrescentado 1 µl de Proteinase K para encerrar a reação. Estes plasmídeos recombinados foram propagados em *E. coli* cálcio competentes de linhagem DH5α e purificados utilizando o kit *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN), conforme recomendações do fabricante.

Os demais vetores selecionados e os fragmentos de DNA correspondentes à Ub (insertos) foram digeridos com as endonucleases de restrição específicas. O gene para Ub foi clonado no pTEX e pTEXp através dos sítios para *EcoRI* (*New England Biolabs – NEB*) e *HindIII* (*NEB*). Para tanto, 50 ng do inserto e 150 ng de cada vetor foram digeridos primeiramente com 20 unidades da enzima *EcoRI* por 2 horas a 37 °C. As digestões foram purificadas com fenol/clorofórmio e precipitada com etanol absoluto e acetato de sódio para então serem digeridas com 20 unidades de *HindIII* por aproximadamente 16 horas a 37 °C.

O gene para Ub foi clonado no pBEX pelos sítios para *EcoRI* e *BamHI* (*NEB*). O vetor e o inserto foram digeridos inicialmente com 20 unidades da enzima *EcoRI* por 2 horas a 37 °C, purificadas e precipitadas como anteriormente e então digeridas com 20 unidades de *BamHI* por aproximadamente 16 horas a 37 °C.

As ligações entre vetores e insertos foram realizadas com o auxílio da enzima *T4DNA Ligase* (*USB Corporation*). Aproximadamente 50 ng dos vetores digeridos foram incubados com 50 ng dos respectivos insertos e 400 unidades da enzima por aproximadamente 16 horas à 16 °C. Os vetores recombinados foram propagados em bactérias cálcio competentes de linhagem DH5α, como

descrito anteriormente e purificados utilizando o kit *QIAprep Spin Miniprep Kit* (*QIAGEN*) conforme recomendações do fabricante.

A verificação das clonagens foi realizada por PCR do plasmídeo purificado ou PCR de colônias de *E. coli* transformadas com os plasmídeos, utilizando os iniciadores para a sequência da Ub e visualizando os resultados por eletroforese da amplificação em matriz de agarose, como descrito anteriormente. Como controle negativo desta verificação, os vetores sem clonagem foram submetido à PCR, também utilizando os iniciadores para a sequência da Ub, nas mesmas condições. A correta inserção da sequência foi avaliada por seqüenciamento dos vetores em um seqüenciador automático de DNA (*Applied Biosystems Thermo Sequenase* modelo 3100 *Genetic Analyser*). A metodologia aplicada no seqüenciamento foi baseada no método de Sanger (Sanger e cols., 1977), o qual utiliza nucleotídeos modificados denominados didesoxirribonucleotídeos trifosfato – ddNTP's –. Estes análogos nucleotídicos são também conhecidos como “terminadores” pois, por não possuírem o 3'OH, não permitem a ligação com o próximo dNTP, encerrando a replicação. Os ddNTPs possuem uma fluorescência diferente para cada base, possibilitando a identificação dos mesmo através da coloração emitida e a interpretação dos resultados são verificados automaticamente através de um gráfico, o cromatograma.

3.12 Eletroforese de proteínas

As proteínas foram analisadas por eletroforese em SDS-PAGE sob condições desnaturantes, conforme o descrito por HAMES & RICKWOOD (1990). As concentrações de géis utilizadas foram de 13% para análise dos enriquecimentos de proteínas ubiquitiladas e de interação com Ub, e 15% para análise da produção e purificação de Ub recombinante. Os volumes das soluções utilizadas para os géis de corrida e de empilhamento estão descritos na tabela 3.

As amostras de proteínas foram preparadas antes de serem aplicadas no gel: foram são diluídas em tampão de amostra de proteína (T.A 4X) na proporção 4:1 (quatro partes de amostra para 1 parte de T.A. 4X). Desta forma,

foram fervidas por 5 minutos, incubadas no gelo por mais 5 minutos e centrifugadas a 14000 x g por 10 minutos.

Soluções	Gel de Corrida		Empilhamento
	13%	15%	
Acrilamida/Bisacrilamida (33/0.9%)	3.8mL	4.4mL	0.7mL
Tris-HCl 2.5 M pH8.8	1.6mL	1.6mL	-
Tris-HCl 1M pH 6.8	-	-	0.6mL
H ₂ O	4.6mL	4mL	3.7mL
SDS 10%	100µL	100µL	50µL
Persulfato de amônio10%	70µL	70µL	35µL
TEMED	7µL	7µL	7µL

Tabela 3: Soluções e quantidades para preparo de gel de poliacrilamida, para empilhamento e corrida de amostras protéicas.

Preparadas as amostras, estas foram aplicadas no gel vertical de poliacrilamida juntamente com o padrão de massa molecular (Bench Mark, *Invitrogen*) e a corrida foi feita em tampão de eletroforese para SDS-PAGE a 30 miliampères, aproximadamente 150 Volts.

3.12.1 Coloração por Coomassie blue

Os resultados obtidos após eletroforese das amostras em SDS-PAGE foram observados pela coloração do gel por Coomassie blue. Para tanto os géis foram incubados por aproximadamente 30 minutos à temperatura ambiente neste corante e, a seguir, os géis foram descorados com solução de descoloração para SDS-PAGE para visualização das bandas.

3.12.2 Coloração por Nitrato de Prata

Outra alternativa de coloração de SDS-PAGE para visualização dos resultados é pela marcação por nitrato de prata que é mais sensível, marcando bandas que poderiam não ser visualizadas pela coloração por Coomassie blue.

Para tanto, as proteínas no gel foram inicialmente fixadas em solução de fixação de SDS-PAGE por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o gel foi lavado 3 vezes com etanol 50%, incubado com solução de sensibilização por 2 minutos e incubados com solução de coloração por prata

por 30 minutos. A revelação foi realizada com solução de revelação depois de lavar o gel com água corrente, e a reação foi parada com solução de término.

3.12.3 Transferência de proteínas para membrana de nitrocelulose

Os ensaios padrões de imuno blot (Towbin e cols., 1979) foram possíveis a partir da transferência de proteínas em gel SDS-PAGE para membrana de nitrocelulose (*Hybond N+*, *Amersham Biosciences*). O gel foi disposto em um suporte e a membrana de nitrocelulose foi colocada sobre o gel, evitando a formação de bolhas. O gel e a membrana foram protegidos por papel 3MM e o suporte contendo ambos foi inserido na cuba de transferência de proteínas juntamente com tampão para transferência gelado. A transferência foi feita por 2 horas a 60 Volts a 4 °C.

Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau S por 5 minutos, para visualização das bandas e marcação, lavada em água corrente e bloqueada em PBS 1X, Tween 20 0,05% e leite 5%, por 1 hora, em temperatura ambiente ou durante a noite a 4° C.

3.13 Expressão de Ub em *E. coli*

A expressão da Ub foi realizada em uma célula cálcio competente de *E. coli*, linhagem BL21(DE3)pLysE. Para tanto, a célula foi transformada com o vetor de expressão recombinado (pDEST17+Ub). A seguir, as células foram incubadas em 1 mL de meio LB por 1 hora a 37 °C sob agitação de 220 rpm, depois inoculadas em 10 mL de meio LB com 100 mg/L de ampicilina e 25 mg/L de cloranfenicol (ampicilina é o antibiótico de seleção do plasmídeo recombinado e cloranfenicol é usado para seleção da cepa de *E.coli* BL21(DE3)pLysE), cultivadas sob agitação (220 rpm) a 37 °C durante a noite (16 horas). As culturas foram diluídas 10 vezes acrescentando 90 mL de meio LB com ampicilina (100 mg/L) e cloranfenicol (25 mg/L), e cultivadas novamente a 37 °C sob agitação (220 rpm) até que a densidade óptica₆₀₀ (D.O.) medida através de espectrofotômetro atinja 0.8 (fase estacionária de crescimento). Para induzir a expressão gênica foi adicionado 0,1 mM de IPTG

(isopropil- β -D-tio-galactopiranosídeo – regulador de atividade da enzima *T7 RNA polymerase*) às culturas e estas foram incubadas por 3 horas nas mesmas condições anteriores. As células cultivadas foram centrifugadas a 5000 x g durante 15 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado.

As proteínas solúveis e insolúveis foram fracionadas. O precipitado foi ressuspenso, lavado com PBS 1x e centrifugado a 5000 x g durante 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, ressuspenso com 5 mL de tampão de lise de bactérias, foi sonicado (lise das células através de ultra-som) à potência 8 por 15 segundos e resfriado em gelo (repetido 4 vezes). Nessa fração estão as proteínas totais expressas pela célula. A solução foi centrifugada novamente a 10000 x g por 10 minutos a 4 °C, no sobrenadante estão as proteínas solúveis e no precipitado a fração de proteínas insolúveis (isoladas em corpúsculos de inclusão). Para solubilizar as proteínas insolúveis, o precipitado foi ressuspenso com tampão de solubilização, sonicado e centrifugado como anteriormente. No sobrenadante estão as proteínas solubilizadas por Uréia. Em todos os tampões de fracionamento foram acrescentados inibidores de proteases PMSF 1mM (Phenylmethyl-sulfonyl fluoride) e E64 1 μ M.

As amostras de proteínas totais, solúveis e insolúveis foram analisadas por SDS (SDS-PAGE) 15%, como já descrito.

A expressão também pôde ser analisada através de ensaios padrões de imuno blot (Towbin e cols., 1979), utilizando anticorpos comerciais anti-histidina de camundongo (*Pharmacia*), que reconhecem a etiqueta de 6 histidinas acrescentada nas proteínas recombinantes. Para revelação foi utilizado um anticorpo secundário conjugado a fosfatase alcalina, tal anticorpo tem especificidade à IgG de camundongo, reconhecendo o anticorpo primário. Esta ligação é detectada pela reação entre fosfatase alcalina, nitroblue tetrazolium (NBT) e 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) (*Promega*) em tampão de revelação, como recomendado pelo fabricante.

3.14 Purificação de Ub recombinante e quantificação

Para a purificação da proteína recombinante, esta foi arranjada em colunas contendo resina de níquel NiNTA-Agarose (QIAGEN). A purificação de Ub solúvel seguiu da seguinte forma: aproximadamente 2 mg de proteína recombinante foram incubados durante a noite, a 4° C e com 500 µL de resina NiNTA-Ag previamente equilibrada com tampão de lise de bactérias. Após incubação a resina foi lavada 5 vezes com 5 mL de tampão de lavagem com Imidazol (gradiente de 20.mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM e 60 mM). A eluição foi realizada em 5 etapas com 1 mL cada de tampão de eluição com Imidazol. A Ub solubilizada com uréia passou pelo mesmo processo de purificação, porém aos tampões utilizados na lavagem e eluição da proteína recombinante foram acrescentados 8M de Uréia, para evitar a precipitação das proteínas.

Os resultados foram de cada etapa de purificação observados em SDS-PAGE, como descrito anteriormente.

As frações protéicas que não tiveram boa purificação com a resina de níquel passaram por uma segunda etapa de purificação utilizando uma metodologia diferente.

A Ub desnaturada com uréia foi purificada em gel preparativo, que consiste na separação das proteínas por massa molecular em gel de acrilamida SDS-PAGE em maiores proporções. O gel é então corado com KCl 0,5M gelado e a banda correspondente a proteína é cortada do gel e eletroeluída em sacos para diálise com 1 ml de solução salina a 50 Volts por 2 horas, este processo foi repetido mais 2 vezes para completa extração das proteínas do gel.

A Ub solúvel foi filtrada por centrifugação em filtro Amicon® Centricon® 50 (AMICON) que retém proteínas com massa molecular acima de 50 kDa, excluindo-as da solução contendo a Ub recombinante. A filtração foi feita a 4° C com tempo variado, até que a amostra passasse completamente pelo filtro.

A dosagem das proteínas recombinantes purificadas foi feito com o auxílio do kit *Micro BCA Protein Assay* (Pierce) seguindo recomendações do fabricante.

3.15 Produção de anticorpos policlonais

Os anticorpos policlonais anti-Ub de *T. cruzi* foram obtidos através da imunização de camundongos fêmeas de linhagem Swiss com aproximadamente 45 dias de idade no início das inoculações. Todos os animais foram tratados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e o protocolo institucional foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FIOCRUZ / Licença de número L-005/09).

A fim de obter anticorpos específicos para Ub, foi realizado um teste pré-imune, para verificar se existiam anticorpos pré-formados pelo camundongo capazes de reconhecer proteínas de *T. cruzi*. Para tanto, foram realizados ensaios de imuno blot, no qual extratos de proteínas totais de *T. cruzi* foram fixados em membrana de nitrocelulose, como descrito anteriormente, e incubados com soros pré-imune de diferentes camundongos. A revelação foi realizada através de reação com fosfatase alcalina (como descrito anteriormente) e alternativamente por um processo de revelação mais sensível, a quimioluminescência. Este processo consiste na utilização de um anticorpo secundário conjugado a peroxidase, revelado com a adição de substrato quimioluminescente (*ECL detection kit, Amersham Biosciences*). O sinal gerado é captado por filme (Hyperfilm™ ECL, *Amersham Biosciences*) conforme as recomendações do fabricante.

Após a seleção dos camundongos que não apresentaram respostas no teste pré-imune, os mesmos foram imunizados por via intraperitoneal, com repetidas inoculações (4 inoculações, uma a cada 15 dias) de 20 µg da proteína recombinante purificada diluída em Adjuvante de Freund completo (*Sigma*) no primeiro dia e Alu-Gel-S (*Serva*) nas demais inoculações.

Uma semana após a 4ª inoculação, uma gota de sangue dos camundongos foi coletada através de excisão da extremidade do rabo, os soros coletados foram testados por imuno blot e, uma vez que a titulação do soro estivesse suficientemente alta, o sangue do animal foi coletado através de punção cardíaca, em no máximo 10 dias após a última inoculação. O material foi mantido em temperatura ambiente por no mínimo 1 hora para a coagulação

do sangue e, então, centrifugado por 30 minutos a 2000 x g. O sobrenadante (anti-soro) foi coletado e armazenado a -20 °C.

3.16 Verificação da especificidade dos anticorpos e análise do perfil de ubiquitilação em gel unidimensional

Para verificar se os anti-soros estavam reconhecendo a Ub, os mesmos foram submetidos a imuno blot para as proteínas recombinantes previamente separadas em gel de poliacrilamida e fixadas em membranas de náilon. Os anti-soros foram diluídos na proporção de 1:200 em PBS 1X e Tween 20 0,05%, e incubados com as proteínas recombinantes por 2 horas a temperatura ambiente, com posterior revelação por reação de fosfatase alcalina.

A análise do perfil de ubiquitilação foi feita em gel unidimensional, para verificar se o padrão observado possui similaridade com os padrões descritos em literatura (Vasilescu e cols., 2005; revisado por Peng, 2008). Tal análise também foi realizada através de ensaios de imuno blot, incubando extratos protéicos totais de *T. cruzi* na fase de epimastigota, contra anti-Ub nas mesmas condições anteriores.

A análise do perfil de ubiquitilação em *T. cruzi* também foi realizada em extratos nos quais foram utilizadas drogas que inibem a atividade do proteassomo de das enzimas de-ubiquitiladoras (DUB). A inibição do proteassomo foi realizada com a adição de 0,5 µM de carbobenzoxy-L-isoleucyl-gamma-t-butyl-L-alanyl-L-leucinal (PSI) em uma cultura de epimastigotas com 3 dias de crescimento, cultivando esta cultura por 5 horas a 28° C. Esta droga conhecida como PSI é um inibidor específico para a atividade quimiotripsina-*like* do proteassomo (Figueiredo-Pereira e cols., 1994). O composto iodoacetamida (IAA) foi utilizado para a inibição das DUB. O IAA é um inibidor de DUB bastante conhecido, porém seu mecanismo de ação ainda não está claro. Este processo foi realizado apenas no momento da preparação do extrato protéico, pois o IAA é extremamente tóxico quando colocado em cultura, levando à morte celular. Portanto, 10 mM de IAA foi acrescentado ao tampão de lise desnaturante para inibição de DUB. Com a inibição de

proteassomo e DUB, as proteínas ubiquitiladas devem ser acumuladas, o que pôde ser verificado por ensaios de imuno blot com anti-Ub.

3.17 Culturas de *T. cruzi* e estresse nutricional de epimastigotas

Para submeter os parasitas ao estresse nutricional e estimular a metaciclo gênese, foram realizados dois repiques sequenciais de uma cultura de epimastigotas em fase logarítmica de crescimento (EPI 3 dias) na concentração de 1×10^6 células/mL em 100 mL de meio LIT em frasco erlenmeyer de 250 mL. A cultura foi mantida à 28 °C por 5 a 6 dias (final de fase exponencial e/ou início de fase estacionária de crescimento) até que a cultura chegasse a densidade celular de 5 a 6×10^7 células/mL em média.

As formas epimastigotas não diferenciadas no final da fase exponencial de crescimento em meio LIT foram submetidas a estresse em meio TAU - *Triatomine Artificial Urine* - (CONTRERAS e col, 1985; BONALDO e col, 1988). Para isso as células foram centrifugadas a 7.000 x g por 5 minutos a 10 °C e então ressuspensas em meio TAU na concentração de $5,0 \times 10^8$ células/mL e incubadas a 28 °C por duas horas (estresse nutricional).

As células de epimastigotas e epimastigotas submetidos a estresse foram centrifugadas a 7.000 x g, por 5 minutos, a 4 °C, lavadas 3 vezes com PBS 1X. Os extrato protéicos foram obtidos após lise com tampão de lise desnaturante, para ensaios de imunoafinidade, e tampão de lise nativa, para ensaios de afinidade por Ub.

3.18 Transfecção de *T.cruzi*

Os parasitas utilizados foram epimastigotas do clone Dm28c - *Didelphis marsupialis* - de *T. cruzi* em fase logarítmica de crescimento (3 dias) (GOLDENBERG & CONTRERAS 1984; CONTRERAS & ARAUJO-JORGE, 1988).

Um total de 4×10^7 células foram incubadas com 50 a 100 µg de plasmídeo no gelo por 10 minutos. A transfecção foi realizada através de

eletroporação (KELLY e col, 1992) usando o eletroporador da BioRad (GenePulser II Electroporator). As condições foram: dois pulsos de 450 Volts e 500 μ F em tampão de eletroporação. Os parasitas transfectados foram cultivados a 28 °C em 10 mL de meio LIT B – *Liver Infusion Tryptose* (CAMARGO, 1964) por 42 horas. Epimastigotas na ausência de plasmídeos também passaram pelo processo de eletroporação para obtenção de um controle negativo para o experimento.

Passadas 42 horas foram acrescentados 250 μ g/mL de antibiótico G418 às culturas transfectadas e à cultura controle. Após 42 horas de incubação a 28 °C, a dose de antibiótico foi aumentada para 500 μ g/mL. As culturas transfectadas e controle foram mantidas com antibiótico em todas as passagens até que as células da cultura controle morreram, nesse ponto os transfectantes estavam selecionados.

3.19 Análise da expressão de Ub recombinante

A expressão foi verificada através de ensaios-padrão de imuno blot, onde extratos protéicos dos parasitas transfectados foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida e fixados em membrana de nitrocelulose para então serem incubados com anticorpo contra a etiqueta fusionada à Ub (anti-histidina para o parasita transfectado com o plasmídeo pTcPR-HisN, e anti-proteína ligadora de calmodulina para o parasita transfectado com o plasmídeo pTcPR-TAP), que reconhece Ub livres e/ou ligadas às proteínas-alvo da ubiquitilação. Para revelação deverá ser usado um anticorpo secundário conjugado a fosfatase alcalina e à peroxidase, como descrito anteriormente.

Tal análise foi realizada com anticorpos anti-Ub para confirmação dos resultados.

3.20 Enriquecimento de proteínas ubiquitiladas

3.20.1 Enriquecimento de proteínas marcadas por Ub nativas

Os extratos protéicos de *T. cruzi* foram obtidos através de lise celular com tampão de lise desnaturante, a fim de que todas as interações não covalentes entre proteínas fossem rompidas, precipitando apenas as proteínas modificadas covalentemente pela Ub. Do mesmo modo, proteínas nucleares e de membrana também podem ser obtidas quando as células são submetidas a lise desnaturante, e é fato que proteínas nucleares (Daniel e cols., 2004; Hoege e cols., 2002) e de membrana (Horak e Wolf, 2001; revisto por Mukhopadhyay e Riezman, 2007) são também ubiquitiladas.

Para tanto, aproximadamente 1×10^8 células lavadas com PBS 1X foram ressuspendidas em 200 μ l de tampão de lise desnaturante, acrescentado 15 unidades/mL de DNase 1 para fragmentação de DNA; incubadas a 95 °C por 10 minutos, no gelo por 5 minutos e então centrifugadas por 10 minutos à rotação de 14.000 x g, coletando o sobrenadante. Ao extrato desnaturado foi acrescentado 2 μ l (1% do volume total) de tampão de lise não desnaturante, o excesso de NP-40 quebra o SDS do extrato, possibilitando a incubação deste com o anticorpo sem danos à sua funcionalidade. O extrato foi dosado com auxílio do kit *Micro BCA Protein Assay* (Pierce) seguindo recomendações do fabricante.

O enriquecimento de proteínas marcadas por Ubs de um extrato protéico complexo foi obtido a partir de ensaios de imunoafinidade. Para tal finalidade, 20 μ l de soro de camundongo contendo anti-Ub e diluído em 100 μ l de PBS 1X e 1 mg/mL de BSA foram incubados por 2 horas à temperatura ambiente com 100 μ l de esferas de proteína G sefarose, sob agitação. Após incubação, a resina foi centrifugada a 600 x g por 1 minuto, o soro restante foi retirado e foi realizada uma reação de *crosslinking* para ligar o anticorpo à proteína G covalentemente, evitando a liberação de anticorpos na amostra eluída da imunoafinidade, o que poderia prejudicar análises posteriores em espectrometria de massas. O *crosslinking* foi possível com o auxílio do reagente dimethyl pimelimidate (DMP): a resina foi lavada por 5 minutos com PBS 1X acrescido de 1 mg/ml de BSA, depois somente com PBS 1X e, então,

incubada por 30 minutos com 0,02 M de DMP diluído em 0,2 M de trietanolamina pH8.0, repetindo este processo 3 vezes, sempre lavando com 0,2 M de trietanolamina pH8.0 entre as incubações. A reação foi parada com 0,05 M de etanolamina pH8.0 e a resina foi lavada 3 vezes com PBS 1X.

Aproximadamente 1,5 mg de extrato protéico foram incubados com 100 µl de resina de anti-Ub durante a noite (16 horas) a 4 °C. A seguir, a resina foi lavada com 5 ml de tampão de lavagem de imunoafinidade e as proteínas foram eluídas 2 vezes com 150 µl de glicina 0,2 M pH 2,5 por 5 minutos, neutralizando o pH logo em seguida com a adição de 15 µl de Tris-HCl pH9.0.

Como controle negativo, o mesmo ensaio foi realizado com soro pré-imune, o qual não apresentou afinidade com proteínas de *T. cruzi*.

As amostras de cada etapa de purificação foram concentradas com TCA (ácido tricloroacético). Às amostras foram acrescentados 10% de TCA e incubadas por 1 hora no gelo. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 4 °C por 30 minutos, a 10000 xg, lavadas 2 vezes com acetona 100%, sempre centrifugando a 10000 x g por 30 minutos a 4° C. Após as lavagens as amostras foram ressuspensas em 15 µl de 100 mM Bicarbonato de Amônio, diluídas em T.A. 4X e separadas em gel SDS-PAGE corado com prata para visualização dos resultados.

3.20.2 Enriquecimento de proteínas marcadas por Ub recombinantes

As proteínas sinalizadas com as Ubs marcadas por etiquetas moleculares foram extraídas do extrato protéico total de *T. cruzi* tranfectado através de purificação por cromatografia de afinidade.

Os extratos protéicos de *T. cruzi* tranfectados foram obtidos através de lise celular com tampão de lise desnaturante (para purificação com resina de níquel) ou não desnaturante (para purificação por imunoafinidade) e tampão de lise para TAP-tag.

O enriquecimento de proteínas-alvo de Ub marcadas por etiqueta de 6 histidinas foi realizado através de cromatografia de afinidade ao níquel, arranjando o extrato protéico total em colunas contendo resina de níquel NiNTA-Agarose (*QIAGEN*), seguindo recomendações do fabricante, e

utilizando diferentes concentrações de Imidazol para lavar (Tampão de lavagem com Imidazol) e eluir (Tampão de eluição com Imidazol).

A purificação por afinidade em série foi realizada com o auxílio de resinas IgG e Calmodulina Sepharose™ (*GE Healthcare Life Sciences*) e da enzima AcTEV™ protease (*Invitrogen*). As resinas ligam-se respectivamente à unidade ligadora de IgG da proteína A (prot.A) e à proteína ligadora de Calmodulina (CBP) inseridas na Ub recombinante, possibilitando duas etapas de purificações em condições nativas, como já descrito em trabalhos anteriores (Rigaut e cols., 1999; Puig e cols., 2002). Inicialmente, 150 µl de esferas de IgG Sepharose foram equilibrados com tampão de ligação IgG e incubados com extrato protéico de aproximadamente 3×10^9 células transfectadas (W9+Ub) por 3 horas a 4 °C sob agitação. A seguir, as proteínas não ligadas à resina foram descartadas e a resina foi lavada com 30 ml de tampão de ligação IgG e, depois, com tampão TEV para equilíbrio pré-digestão. Para eluir as proteínas da resina de IgG Sepharose, foram acrescentadas 100 unidades da enzima AcTEV diluídas em 1 ml de tampão TEV. A protease TEV reconhece um sítio localizado entre os dois fragmentos da etiqueta (prot.A e CBP) e o digere, liberando a proteína recombinante (Ub) ainda fusionada à CBP. Esta digestão foi realizada a 4 °C por 16 horas. As proteínas eluídas após a digestão foram incubadas com 3 mM de CaCl_2 e 150 µl de esferas de Calmodulina Sepharose previamente equilibradas com tampão de ligação C. A incubação foi feita a 4 °C por 2 horas. Foram descartadas as proteínas não ligadas e a resina foi lavada com 30 ml de tampão de ligação C + 10mM de β-mercaptoetanol. A eluição foi feita com 800 µl de tampão de eluição C.

As amostras de cada etapa de purificação foram concentradas com TCA 10%, como descrito anteriormente, e separadas em gel de SDS-PAGE corado com prata para visualização dos resultados.

3.21 Enriquecimento de proteínas de interação com Ub.

Para a realização do ensaio de afinidade por Ub, inicialmente a Ub recombinante funcional de *T. cruzi*, foi imobilizada em resina *CNBr-activated Sepharose 4B* (Amersham Biosciences): aproximadamente 30 mg de resina

CNBr-activated Sepharose 4B drenada foram ativadas com 6 mL de 1mM HCl, agitando suavemente até que toda a resina estivesse hidratada, cuidando para que não excedesse 10 minutos de incubação com HCl (30 mg de resina é a quantidade necessária para obter aproximadamente 100 µl de resina hidratada). A resina foi centrifugada a 600 x g por 1 minuto, o sobrenadante descartado e foi acrescentado 1 mL de tampão de acoplamento para equilibrar a resina. A seguir, a resina foi centrifugada nas mesmas condições e o tampão de acoplamento foi substituído por 1 mg da proteína a ser ligada na resina, neste caso, a Ub recombinante funcional, diluída em tampão de acoplamento para possibilitar a ligação (a capacidade de acoplamento da resina é de 5 a 10 mg de proteína por mL de resina), a incubação foi feita durante a noite (16 horas) a 4° C. Decorrido este tempo, a resina foi bloqueada com 1 mL de 0,2M Glicina pH8.0 por 2 horas à temperatura ambiente e lavada 3 vezes com tampão de 0,1M Acetato pH4.0 / 0,5M NaCl intercalando com tampão de acoplamento.

Aproximadamente 1 mg de extrato protéico de epimastigotas de *T. cruzi* com 3 dias de crescimento e submetidas a estresse foram obtidos através de lise hipotônica com tampão de lise não desnaturante: 1 x 10⁹ células previamente lavadas com PBS 1X foram ressuspensas em tampão de lise não desnaturante e incubadas por 2 horas a 4° C sob agitação constante para permeabilizar a membrana celular e extrair as proteínas, sem que haja rompimento de membranas e extravasamento de conteúdo nuclear. O lisado foi centrifugado a 14000 x g por 10 minutos a 4° C e o sobrenadante foi incubado com a resina de Ub, preparada anteriormente, durante a noite a 4° C.

Após incubação a resina foi lavada com diferentes concentrações de sal: foi lavada 2 vezes com 2mL de tampão de lise não desnaturante, em seguida, com a mesma quantidade de tampão de lise não desnaturante acrescido de 0,5M de NaCl, e depois com as mesmas quantidades de tampão de lise não desnaturante com 1M de NaCl. As proteínas ligadas na resina de Ub foram eluídas 2 vezes com 150 µl de 0,2M glicina pH2.5, ajustando o pH para 8.0 logo em seguida.

Como controle negativo o mesmo ensaio foi realizado em resina de sefarose ativada e bloqueada, porém, sem a Ub fusionada, para verificar se existia uma reação inespecífica entre a resina de sefarose e as proteínas de

T. cruzi. Outro controle utilizado foi o ensaio de competição, onde o extrato protéico do parasita foi incubado com a Ub recombinante antes de ser incubado com a resina de Ub, o que deslocaria as proteínas de interação com Ub para a Ub recombinante existente na solução.

As amostras de cada etapa da afinidade foram concentradas com TCA 10%, como descrito anteriormente, e separadas em gel SDS-PAGE corado com prata para visualização dos resultados.

3.22 Identificação das proteínas de interação com Ub

As proteínas obtidas no enriquecimento foram separadas em gel de poliacrilamida 13% unidimensional corado com nitrato de prata, as bandas mais intensas foram cortadas do gel, descoradas com 50 mM de tiosulfato de sódio e 15 mM de ferricianato de potássio por 10 minutos. As bandas assim obtidas foram lavadas com 50 mM de bicarbonato de amônio até que ficassem totalmente transparentes.

Em seguida, foi realizada redução das pontes dissulfeto das proteínas. Para tanto, os pedaços de gel foram desidratados com acetonitrila (ACN) 100%, após remoção da ACN, as bandas foram reidratadas com 100 µl de 20 mM DTT diluído em 50 mM de bicarbonato de amônio, a reação foi incubada por 45 minutos a 60° C. Após a redução das pontes dissulfeto, o DTT foi removido e os pedaços de gel foram cobertos com aproximadamente 100 µl de 55 mM IAA em 50 mM de bicarbonato de amônio para a alquilação da amostra, a reação foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente no escuro. Por fim, o IAA foi removido da amostra e esta foi lavada com bicarbonato de amônio 1 vez, o lavado foi descartado e à amostra foram adicionados mais 100 µl de bicarbonato de amônio e incubado por 1 hora sob agitação.

Logo depois, as amostras foram submetidas à digestão com a enzima tripsina (*Promega*): os pedaços de gel foram desidratados com ACN, como anteriormente, e reidratados no gelo com 10 µl de solução de tripsina 10 ng/µl, diluída em 50 mM de bicarbonato de amônio. Após reidratação o restante de solução de tripsina foi removido e os pedaços de gel foram cobertos com 50 mM de bicarbonato de amônio. A reação foi incubada por 14 horas a 37° C.

Após esta digestão, as amostras foram eluídas do gel com 20 µl de TFA 1%, incubando por 5 minutos à temperatura ambiente. Os pedaços de gel foram desidratados para remoção dos peptídeos. O produto obtido foi seco em *speed vac* e então ressuspensão em 20 µl de TFA 0,1%. A seguir, foram dessalinizados e concentrados usando a técnica *Stop and Go Extraction tip* (STAGE tip), previamente descrita por Rappsilber e cols. (2003), onde os peptídeos são retidos em uma resina C18 que os retém por hidrofobicidade. O suporte da resina é uma ponteira de 200 µl. A condição para a retenção dos peptídeos é que estejam em solução ácida com pH entre 2 e 4. Para tanto, foi acrescentado TFA (ácido trifluoroacético) às amostras até atingirem a acidez ideal. A resina foi ativada com 100 µl de ACN 100% e equilibrada com 100 µl de ACN 5% e TFA 0,1%. As amostras foram passadas pela resina, a resina lavada com 100 µl de ACN 5% e TFA 0,1% e os peptídeos foram eluídos com 20 µl de ACN 80% e TFA 0,1%. As amostras foram secas em *speed vac* e ressuspensas em 2 µl de TFA 0,1%.

Preparadas as amostras, as mesmas foram submetidas à análise por espectrometria de massas: Os peptídeos purificados foram misturados na proporção de 1:1 com a solução de cristalização (5 mg/ml de ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinâmico em 50% de acetonitrila - ACN e 0,1% de ácido trifluoroacético - TFA). Dois microlitros de cada mistura foram aplicados na placa de MALDI e analisados após completa secagem do solvente por evaporação. Os espectros de massas foram obtidos em equipamento MALDI-TOF/TOF Autoflex (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), operado em modo positivo, com o programa AutoFlexControl.

A análise dos espectros pelo algoritmo do programa FlexAnalysis v 2.0 (Bruker Daltonics) gerou uma lista de massas em um arquivo com extensão .xml. A identificação das proteínas foi feita pelo algoritmo de busca Mascot que comparou os valores das massas obtidas experimentalmente com os valores teóricos contidos em um banco de proteínas exclusivo de T. cruzi CL Brener disponível em <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/tca1/tca1.shtml>

Os parâmetros utilizados no Mascot constam na tabela 4:

Clivagens perdidas	1
Modificação fixa	Carbamidomethyl (C)
Modificação variável	Oxidação (M)
Tolerância para peptídeos	100 ppm
Valores de massas	MH ⁺
Massa	Monoisotópica

Tabela 4: Parâmetros usados na busca de proteínas pelo Mascot.

Como critério de validação das proteínas foi estabelecido o limiar $p \leq 0,2$, onde p é a probabilidade do pareamento entre as sequências ser um evento randômico.

4. RESULTADOS

4.1 Desenho de iniciadores e amplificação da Ub

Os iniciadores foram desenhados com base na sequência nucleotídica do gene que codifica uma Ub de *T. cruzi* (Figura 8). Com o auxílio do programa *Primer select* foi possível excluir os dímeros e grampos que poderiam ser formados durante a PCR.

```
ATGCAGATCTTTGTGAAGACACTGACGGGCAAGACGATCGCGCTCGAGGTGGAATCCA  
GCGACACCATTTGAGAACGTGAAGGCGAAGATCCAGGACAAGGAAGGCATTCCACCGGA  
CCAGCAGCGCCTGATCTTCGCTGGCAAGCAGCTGGAGGACGGCCGCACGCTTGCAGAC  
TACAACATCCAGAAGGAGTCCACGCTGCACCTTGTGCTGCGCCTGCGCGGCGGCTAA
```

Figura 8. Sequência nucleotídica da Ub de *T. cruzi*. Sequência com 231 pb, usada como base para o desenho dos iniciadores para amplificação da Ub.

Aos iniciadores foram acrescentadas seqüências de bases para a ligação entre o gene e o vetor. Essas seqüências correspondem a sítios de endonucleases de restrição que possibilitam a formação de extremidades coesivas entre inserto e vetor, permitindo assim a ligação entre os mesmos. Aos iniciadores das seqüências que serão usadas para clonagem na plataforma Gateway®, foram inseridas seqüências adaptadoras chamadas attB1 e attB2. As características dos iniciadores desenhados estão apresentadas na Tabela 5.

INICIADORES	SEQUENCIA	T _m
attb1_Ub F'	5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCAGATCTTTGTGAAG ACACTG 3'	70.5 °C
attb2_Ub R'	5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCGCCGCCGCGCAGGCGC AG 3'	78.7 °C
EcoRI_6His_Ub F'	5'GGAATTCATGCATCATCATCATCATCAGATCTTTGTGAAGACACTG ACGGGC 3'	70.5 °C
HindIII_Ub R'	5' CCCAAGCTTTAGCCGCCGCGCAGGC 3'	67.4 °C
BamHI_Ub R'	5' CGGGATCCTTAGCCGCCGCGCAGGCGCAG 3'	72.8 °C

Tabela 5: Características dos iniciadores desenhados para Ub. Estão identificados o nome do iniciador, sua respectiva seqüência e Temperatura de Fusão (T_m). Os nucleotídeos em destaque nos iniciadores correspondem aos sítios de reconhecimento de endonucleases ou sítios attB para recombinação com o vetor de entrada pDONR™221, e em negrito está a sequencia de nucleotídeos que irá expressar a etiqueta de 6 histidinas. Legenda: F' = iniciador direto (*forward*); R' = iniciador reverso.

A amplificação do gene da Ub resultou nos produtos com tamanho esperado (Figura 9A). Algumas outras seqüências maiores foram amplificadas, como mostra a figura 9A, tais bandas são referentes à amplificação de 2 e 3 genes de Ub fusionados (banda a 600pb e 900pb respectivamente), pois os genes de Ub são encontrados no genoma dos eucariotos como genes de poliubiquitinas, com várias repetições em sequência. Portanto, os produtos das amplificações foram purificados em gel de agarose para eliminação destas bandas indesejadas, bem como dos iniciadores, resultando em uma única banda correspondente ao gene da Ub fusionado às sequencias adaptadoras attB1 e 2 ou sítios para as enzimas de restrição (Figura 9B).

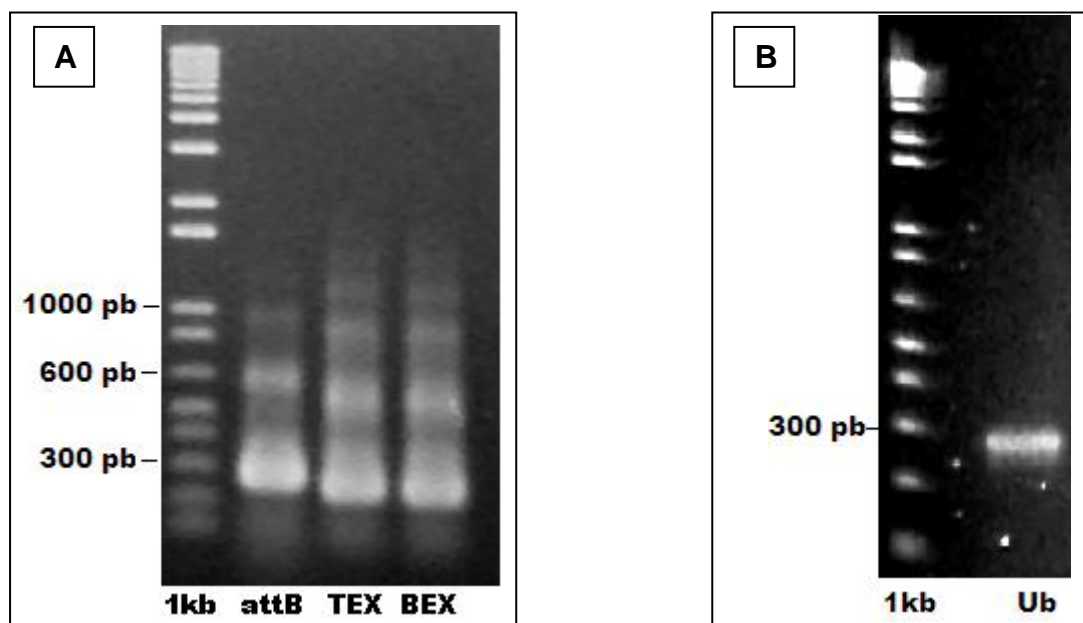


Figura 9. Amplificações do gene para Ub (A) e representação da purificação do produto de amplificação (B).

É possível observar as bandas correspondentes aos produtos de amplificação da Ub (aproximadamente 250 pb). Legenda: 1kb = padrão de massa molecular *1 kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen); attb = Ub com sítios attB para clonagem na plataforma Gateway®, BEX = Ub para clonagem em pBEX; TEX = Ub para clonagem em pTEX e pTEXp. Nota-se um aumento na massa molecular de Ub com attB, pois os sítios attB aumentam em torno de 32 nucleotídeos no fragmento. Matriz de Agarose 1,5%.

4.2 Clonagem nos vetores selecionados

Depois de purificados em gel de agarose, os produtos de PCR de Ub foram clonados em seus respectivos vetores. A confirmação da inserção da sequencia correspondente ao gene de Ub nos vetores foi feita por PCR de

plasmídeos purificados e de colônias de *E. coli* transformadas com estes plasmídeos (Figura 10). Através deste ensaio pode-se verificar que a clonagem no vetor pTEXp não foi realizada com sucesso (Figura 10 D).

Foi realizado o seqüenciamento dos clones obtidos, que confirmou a correta inserção dos fragmentos nos vetores pDEST17, pTEX, pTcPR-TAP e pTcPR-HisN. Para o vetor pBEX o seqüenciamento mostrou que a clonagem não havia ocorrido. Portanto, a transfecção dos parasitas foi realizada apenas com pTEX+ub, pTcPR-TAP+ub e pTcPR-HisN+ub. A transformação de *E. coli* com o plasmídeo pDEST17+ub também foi realizada

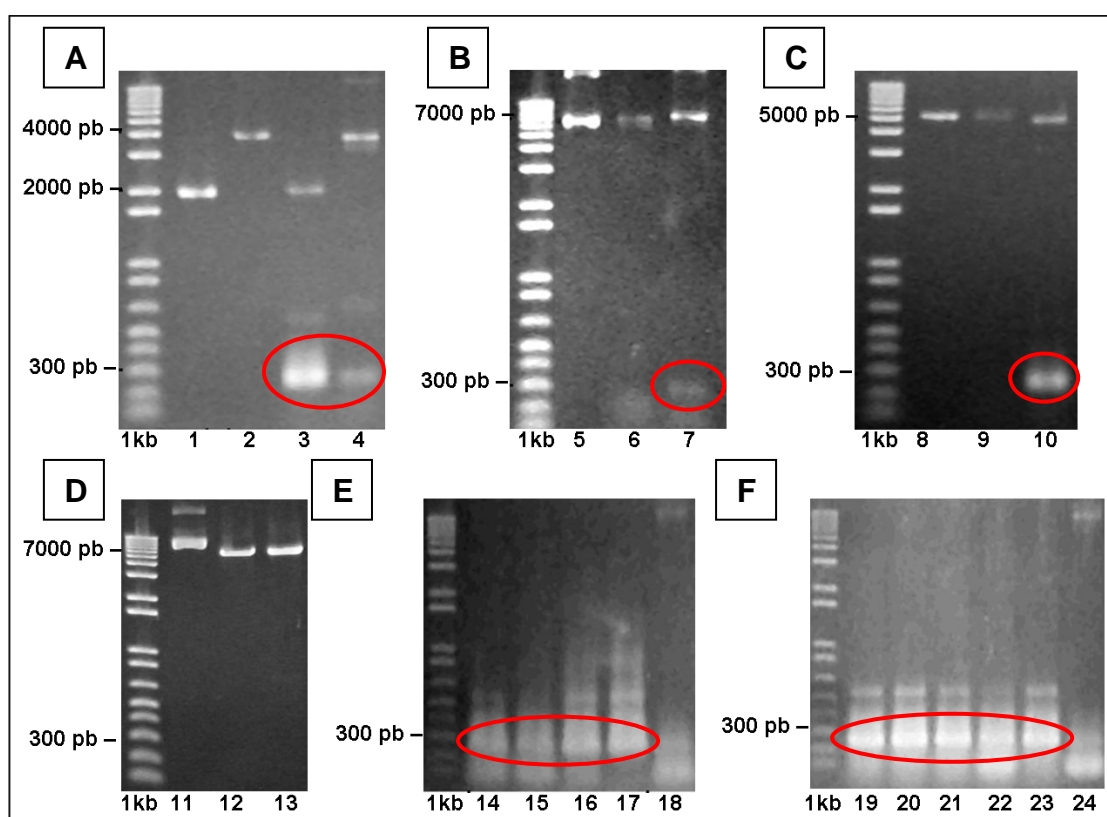


Figura 10. PCR de plasmídeo e de colônia.

É possível observar as bandas correspondentes aos produtos de amplificação da Ub (aproximadamente 250 pb, destacado por círculo vermelho). PCR dos plasmídeos pDONR+Ub e pDEST+Ub (A), pBEX+Ub (B), pTEX+Ub (C), pTEXp+Ub (D), pTcPR-HisN+Ub (E) e pTcPR-TAP+Ub (F). Legendas: 1kb = padrão de massa molecular *1 kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen); 1, 2, 6, 9, 12, 18 e 24 = controles negativos; 5, 8, 11 = clones. Matriz de Agarose 1,5%.

4.3 Transformação de *E. coli* e análise da expressão de Ub recombinante

Os clones em pDEST17 foram expressos em cepa de *E.coli* linhagem BL21(DE3)pLysE, produzindo Ub recombinante solúvel e em corpúsculos de inclusão, solubilizados por uréia (desnaturadas) (Figura 11 A), resultado confirmado por *Imuno blot* com anticorpos anti-histidina, que reconheceram a etiqueta de histidinas inserida na proteína recombinante (Figura 11 B). A Ub possui massa molecular correspondente a 8,5 kDa, porém, a sequência de 6 histidinas da etiqueta pode aumentá-la até 4 kDa.

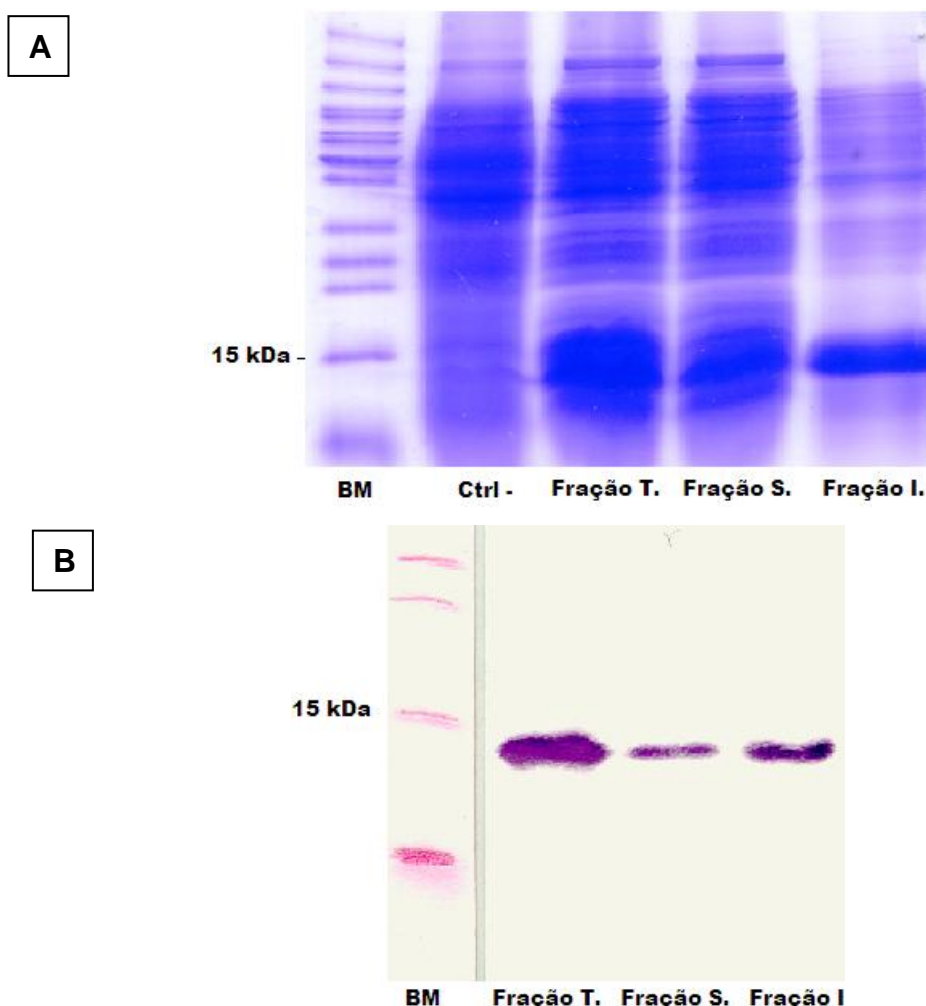


Figura 11. Expressão de Ub em células BL21(DE3)pLysE.

Legenda: B.M = BenchMark – padrão de massa molecular; Ctrl- = Controle negativo - extrato de proteínas produzidas pela célula BL21(DE3)pLysE sem o plasmídeo; Fração T. – fração protéica total, proteínas expressas pela célula; Fração S. – fração de proteínas solúveis; Fração I. – fração de proteínas insolúveis. Matriz de SDS-PAGE 20% corado com Coomassie blue (A) e transferido para nitrocelulose (B).

4.4 Purificação de Ub recombinante e dosagem

A Ub recombinante possui uma etiqueta de histidinas, que permite a sua purificação por coluna de afinidade ao níquel.

Algumas proteínas de *E. coli* possuem grandes quantidades de histidina em sua composição, ficando retidas na resina e podendo ser eluídas juntamente com a proteína recombinante de interesse. Para eliminar tais contaminantes, um segundo passo de purificação foi feito: gel preparativo para as proteínas desnaturadas e filtração por Centricon (*AMICON*) para as proteínas solúveis.

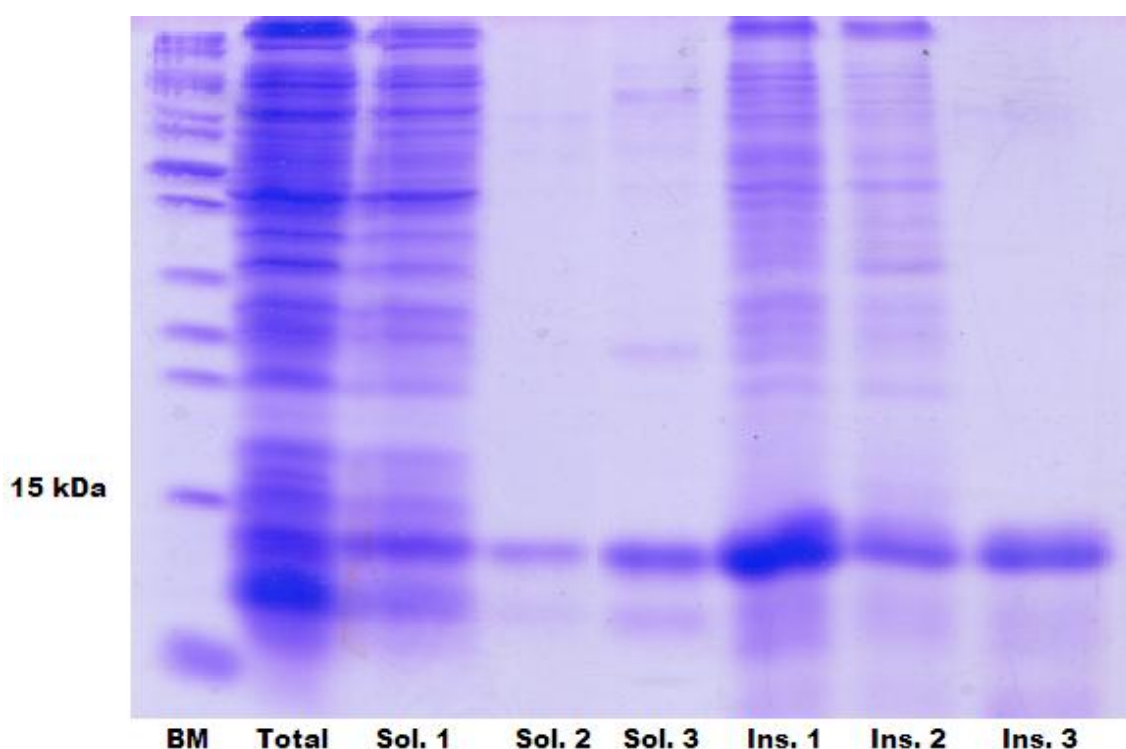


Figura 12. Purificação de Ub.

Legenda: BM - padrão de massa molecular *Bench Mark* (*Invitrogen*); Total – fração de proteínas totais; Sol. 1 – fração solúvel sem purificação; Sol. 2 – fração solúvel purificada com centricon, após purificação com NiNTA; Sol. 3 – fração solúvel purificada com NiNTA; Ins. 1 – fração insolúvel sem purificação; Ins. 2 – fração insolúvel purificada com NiNTA; Ins. 3 – fração insolúvel purificada por gel preparativo. Matriz de SDS-PAGE 20% corado com Coomassie blue.

As proteínas foram concentradas e dosadas antes das inoculações serem iniciadas.

4.5 Produção de anticorpos para Ub

Antes do início das imunizações, foram coletados os soros dos camundongos a fim de verificar se os mesmos estavam reagindo ou não com o extrato protéico de *T. cruzi*. Para tanto, foi realizado um ensaio de *Imuno blot* onde o extrato de proteínas de *T. cruzi* foi separado em gel de acrilamida SDS-PAGE e fixado em membrana de náilon. A seguir, as membranas com os extratos foram incubadas com os soros pré-ímmunes por 1 hora à temperatura ambiente. A revelação foi realizada por reação da fosfatase alcalina (Figura 13A) e por quimioluminescência (Figura 13B). O resultado confirmou a falta de reconhecimento dos anticorpos dos camundongos por proteínas inespecíficas de *T. cruzi*, o que poderia comprometer os resultados de experimentos futuros.

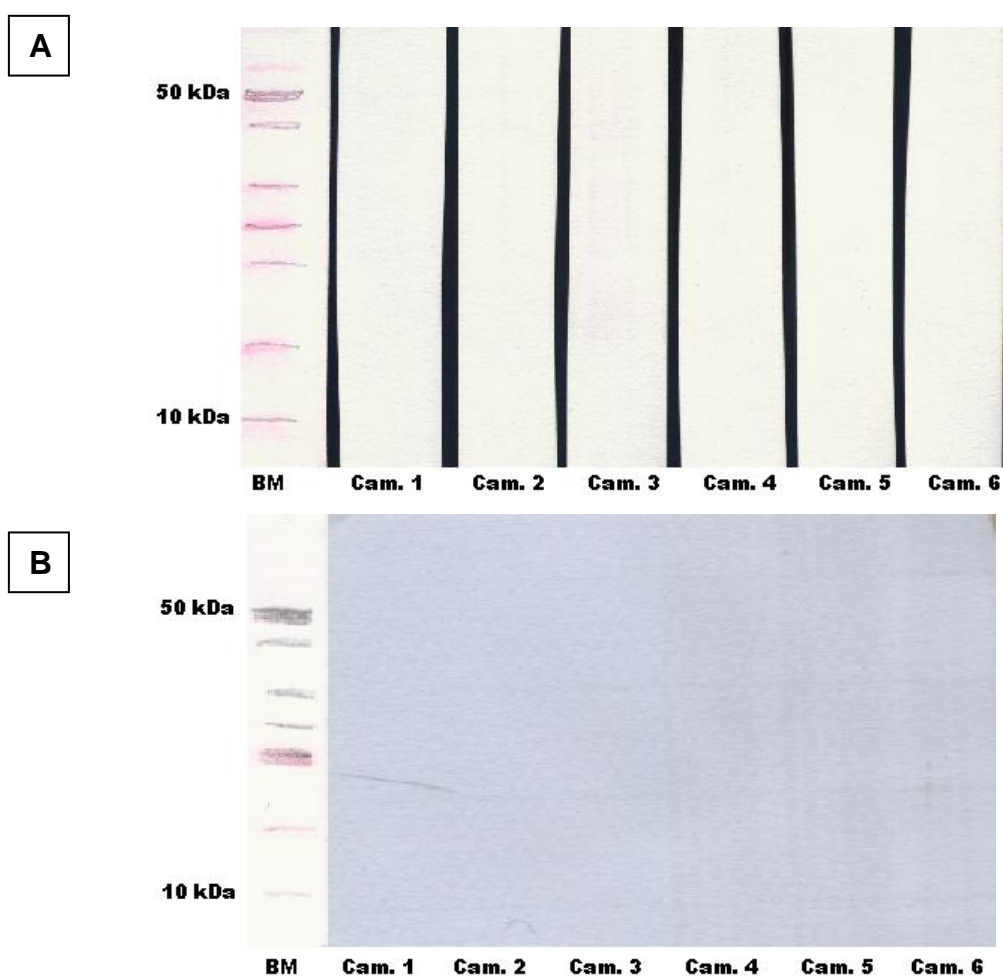


Figura 13. Teste de soro pré-imune.

Imuno blot de extratos protéicos de *T. cruzi* contra soro de camundongos antes de serem imunizados com a proteína recombinante. (A) Revelação por fosfatase alcalina; (B) Revelação por quimioluminescência. Legenda: BM – Padrão de massa molecular *Bench Mark* (*Invitrogen*); Cam.1 a Cam. 6 – Soro de Camundongo 1 a 6.

Dos 6 camundongos testados, 4 foram utilizados para a produção de anticorpos: 2 camundongos para a Ub solúvel e outros 2 para a Ub insolúvel, objetivando produzir anticorpos que reconhecessem epítomos conformacionais e de seqüência de peptídeos, respectivamente. Os camundongos foram numerados 1 a 4, 1 e 2 foram inoculados com a Ub solúvel e 3 e 4 foram inoculados com a Ub insolúvel.

Foram realizadas 4 inoculações intraperitoniais, com doses de 20 µg de proteína por inoculação para cada animal. Uma semana após as 4 inoculações, uma gota de sangue foi retirada do rabo de cada camundongo para verificar se havia resposta imunológica. Após a confirmação da resposta e titulação do soro, os mesmos foram coletados por punção cardíaca e utilizados na diluição de 1:200 em ensaios de imuno blot contra as Ub recombinantes (Figura 14 A) e extratos protéicos de *T. cruzi* na fase de epimastigotas (Figura 14 B).

Nota-se na figura 14 A que o soro do camundongo 1 não reconheceu as proteínas recombinantes no imuno blot. Uma possível explicação seria devido à variabilidade individual da resposta imunológica dos camundongos, sendo que o camundongo 1 não respondeu ao estímulo gerado pela inoculação da proteína recombinante, enquanto os demais mostraram resposta. O soro de todos os camundongos foi coletado, processado e armazenado a -20° C.

O perfil encontrado no imuno blot contra extrato protéico de *T. cruzi* (Figura 14 B) é semelhante ao encontrado em outros eucariotos, apresentando uma “mancha” de alta massa, que corresponde à marcação de todas as proteínas que são mono, pluri ou poliubiquitiladas, em especial as poliubiquitiladas por possuírem um tamanho bastante aumentado devido à grande quantidade de Ub adicionadas às mesmas.

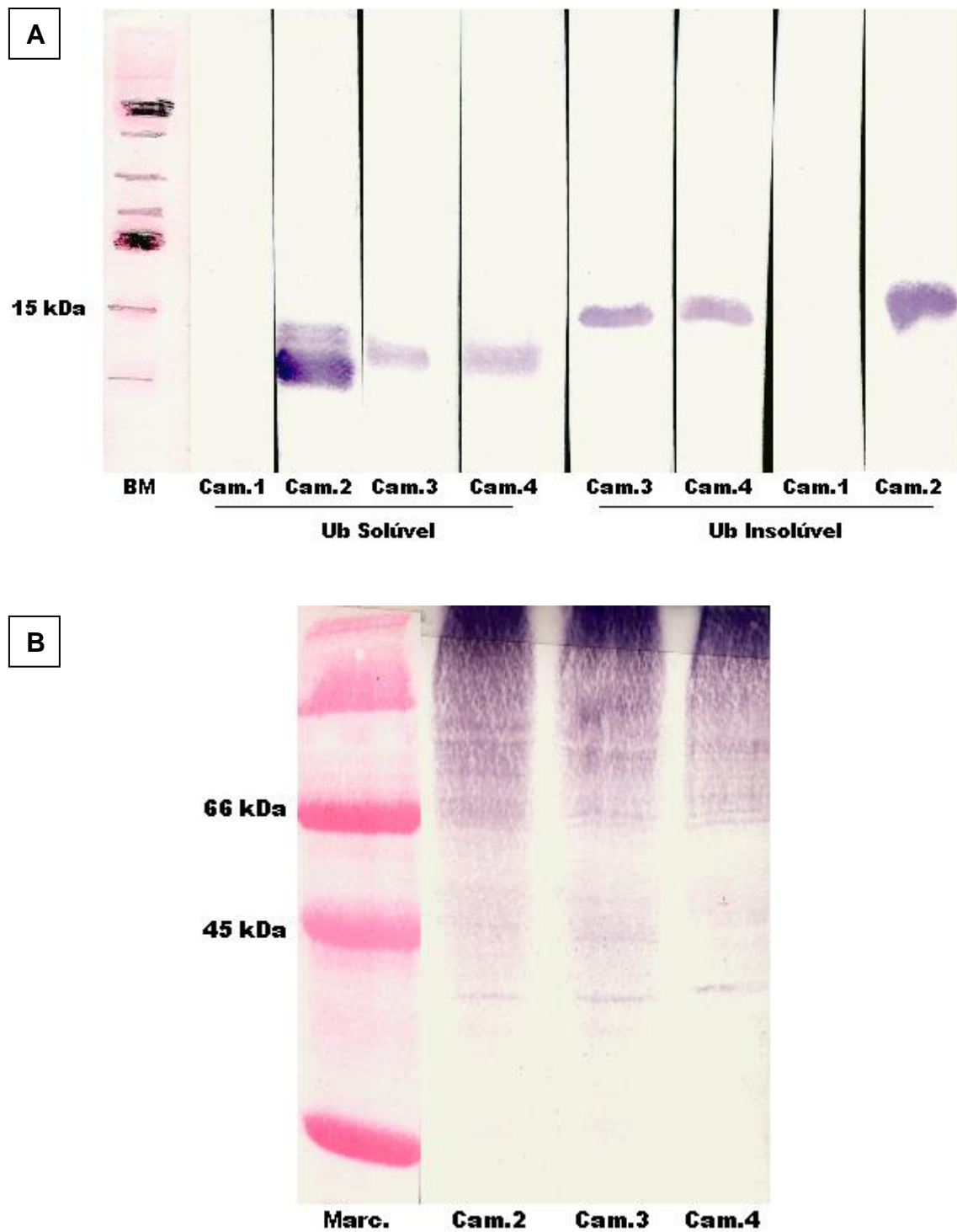


Figura 14. Teste de soro imune.

Imuno blot utilizando soros de camundongos imunizados com a Ub recombinante solúvel e insolúvel. (A) reação contra Ub recombinantes solúvel e insolúvel; (B) extrato de epimastigotas de *T. cruzi*. Revelação por fosfatase alcalina. Legenda: BM – Padrão de massa molecular *Bench Mark* (*Invitrogen*); Marc – Padrão de massa molecular (*Sigma*); Cam. 1 a Cam. 4 – Soro de Camundongo 1 a 4.

Com a finalidade de acumular proteínas ubiquitiladas no extrato protéico, o proteassomo e as DUBs foram inibidas com 0,5 μ M PSI e 10 mM de IAA respectivamente. Os extratos foram analisados por imuno blot, comparando o perfil encontrado em extratos onde proteassomo e DUB estavam inibidos e em extratos sem inibição dos mesmos (Figura 15 A). Como controle foi utilizado o perfil eletroforético das amostras em gel de SDS-PAGE 13% corado com prata, com as mesmas quantidades usadas no imuno blot (Figura 15 B).

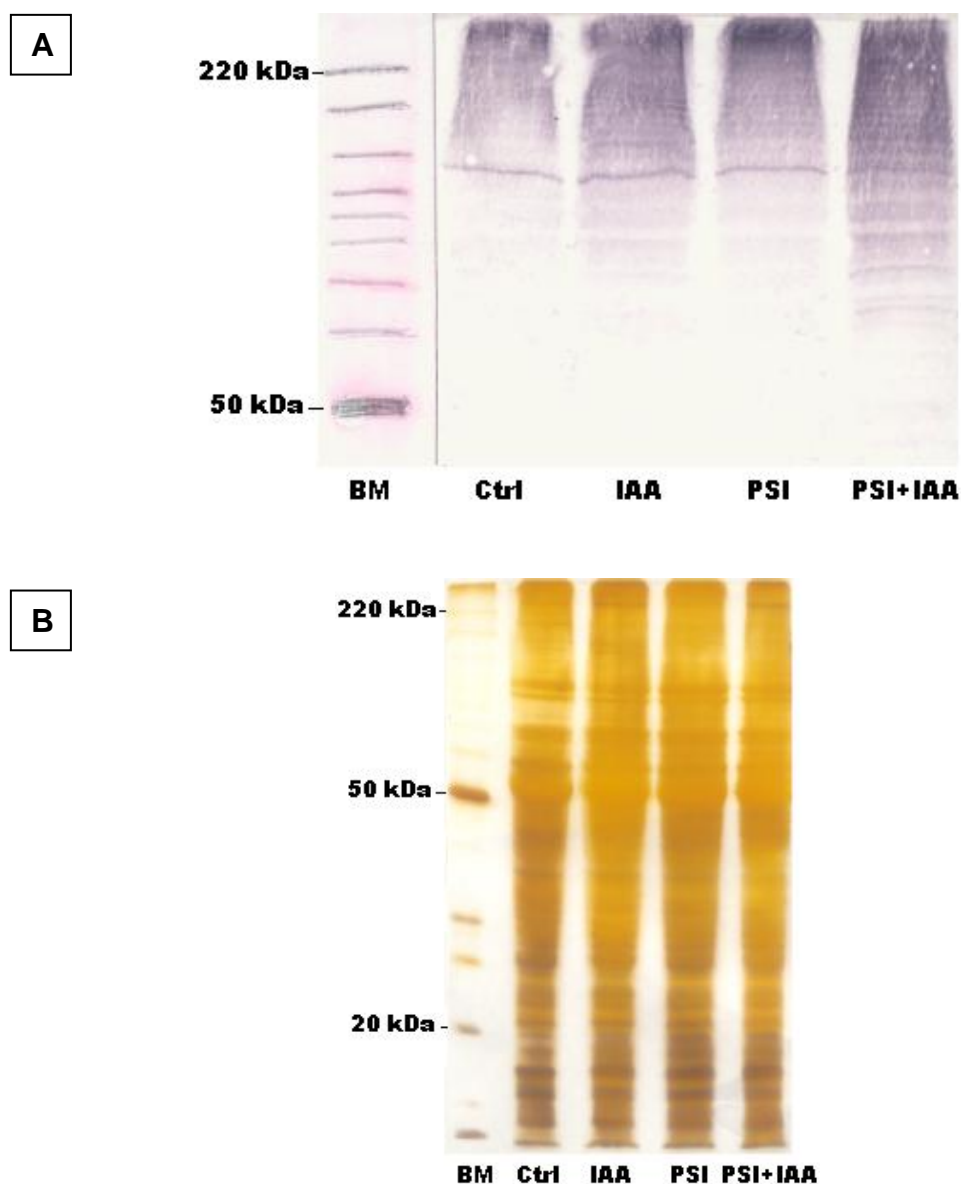


Figura 15. Ensaio de inibição de proteassomo e DUBs.

Em (A) *Imuno blot* utilizando anti-Ub contra extratos de epimastigotas (Ctrl) preparados com IAA para inibição de DUBs (IAA), PSI para inibição de proteassomo (PSI) e os 2 inibidores juntos (PSI+IAA). (B) Matriz de SDS-PAGE 13% corado com nitrato de prata apresenta perfil eletroforético do extrato de epimastigotas de *T. cruzi* com as mesmas quantidades aplicadas na realização do imuno blot (50 μ g) e corado com nitrato de prata. Legenda: BM – Padrão de massa molecular *Bench Mark* (Invitrogen).

Analisando os resultados é possível verificar um aumento razoável do sinal quando apenas o proteassomo é inibido, um aumento maior do sinal quando apenas as DUBs são inibidas, e um significativo aumento do sinal de proteínas ubiquitiladas quando ambos estão inibidos.

4.6 Transfecção de *T.cruzi* e análise da expressão de Ub recombinante

Células de *T. cruzi* na fase de epimastigotas com 3 dias de crescimento foram transfectadas com 50 µg de cada plasmídeo. Os transfectantes foram selecionados com passagens a cada 4 a 5 dias e mantidos com 500 µg/mL de antibiótico G418. Após 20 dias de cultivo, todos os parasitas da cultura controle (sem transfecção, mantidos com antibiótico) morreram, enquanto os parasitas das culturas transfectadas continuaram vivos e replicando, indicando então que foram selecionados nesta cultura apenas os parasitas transfectados.

Após a seleção foram extraídos os extratos protéicos totais de cada transfectante para análise da expressão da Ub recombinante através de ensaios padrões de *Imuno blot* (Figura 16). A partir desta análise pudemos verificar que apenas o parasita transfectado com o plasmídeo pTcPR-TAP+Ub estava expressando a Ub recombinante (Figura 16, sinalizado por setas), enquanto que os demais, pTcPR-HisN+Ub e pTEX+Ub, não apresentaram sinal de expressão diferenciada. Portanto ensaios de purificação de transfectantes foram realizados apenas com o transfectante pTcPR-TAP+Ub.

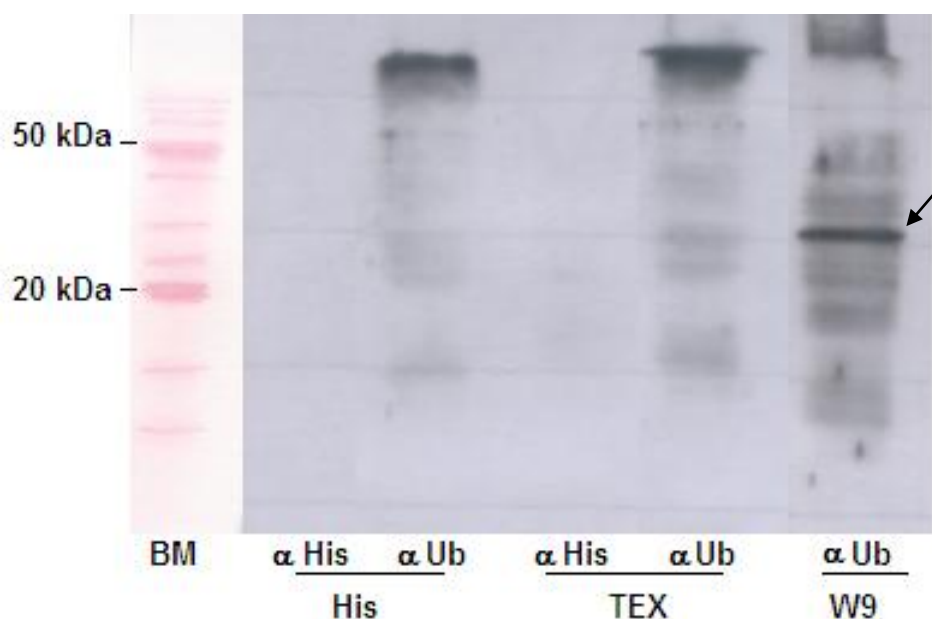


Figura 16. Análise da expressão de Ub recombinante.

Imuno blot de extratos protéicos de *T. cruzi* transfectado com pTcPR-HisN+Ub (His), pTEX+Ub (TEX) e pTcPR-TAP+Ub (W9), contra anti-Ub recombinante (α Ub) e anti-histidina (α His). Revelação por quimioluminescência. A seta indica a Ub recombinante fusionada com TAP tag, aumentando seu tamanho de 8kDa para aproximadamente 30kDa.

4.7 Enriquecimento de proteínas ubiquitiladas

O enriquecimento de proteínas ubiquitiladas, marcadas com Ub nativas ou recombinantes, foi realizado como citado anteriormente.

Todas as frações de cada enriquecimento foram separadas em gel de poliacrilamida e submetidas a ensaios de imuno blot para análise.

4.7.1 Ensaio de TAP-tag

A purificação por afinidade em série (TAP) necessita de padronizações. Pois, analisando os resultados (Figura 17), verificamos que existe ligação entre a proteína recombinante e a primeira resina do sistema (IgG), porém, nos demais passos da purificação não foi obtido sucesso. De acordo com o resultado observado no imuno blot (Figura 17B) o processo de digestão com a protease TEV não foi eficiente, podendo estar nesta etapa o problema desta técnica. Os transfectantes foram congelados a -70°C , mas, devido ao curto espaço de tempo disponível, a padronização desta técnica em *T. cruzi* foi adiada.

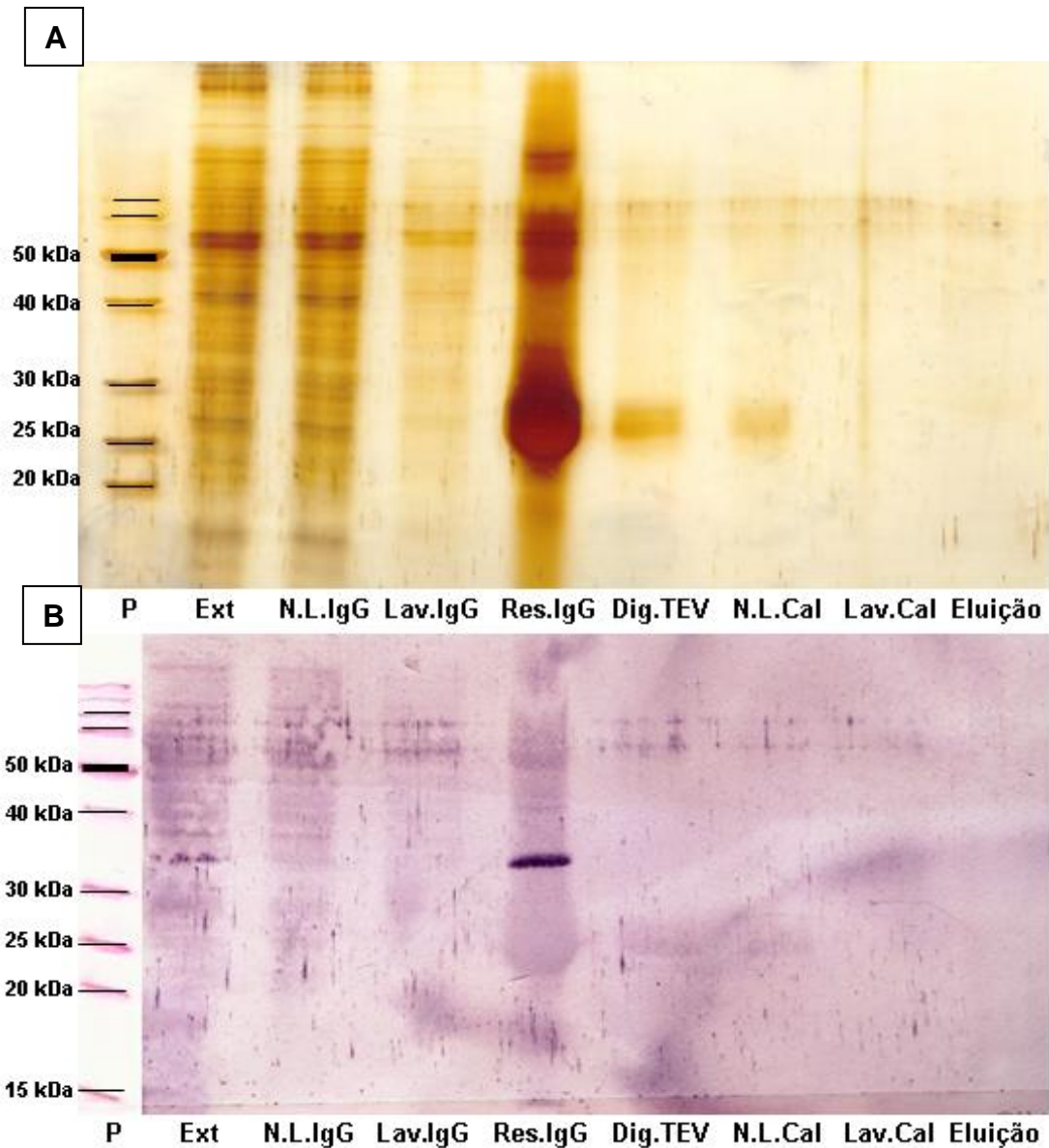


Figura 17. Enriquecimento de Ub recombinante com purificação por afinidade em série. Extratos protéicos de *T. cruzi* em diferentes etapas da purificação do parasita transfectado com pTcPR-TAP+Ub. Legenda: P – Padrão de massa molecular; Ext - extrato protéico total do transfectante; N.L.IgG - Fração de proteínas não ligadas na resina IgG; Lav.IgG - Fração de proteínas lavadas da resina IgG; Dig.TEV - Frações de proteínas obtidas após digestão com TEV; N.L.Cal - Fração de proteínas não ligadas na resina Calmodulina; Lav.Cal - Fração de proteínas lavadas da resina Calmodulina; Eluição - Proteínas eluídas da resina de Calmodulina. Matriz de SDS-PAGE 13% corado com nitrato de prata (A) e imuno blot (B).

4.7.2 Imunoprecipitação

O enriquecimento de proteínas ubiquitiladas nativas de *T. cruzi*, tanto na fase de epimastigotas quanto epimastigotas submetidos a estresse, foi realizado em ensaio de imunoafinidade de Ub nativas utilizando o anticorpo obtido no início deste projeto. A análise dos resultados deste ensaio foi feita por

gel de poliacrilamida (Figura 18). Tal análise mostrou que o enriquecimento das proteínas alvos de ubiquitilação por esta técnica foi eficiente.

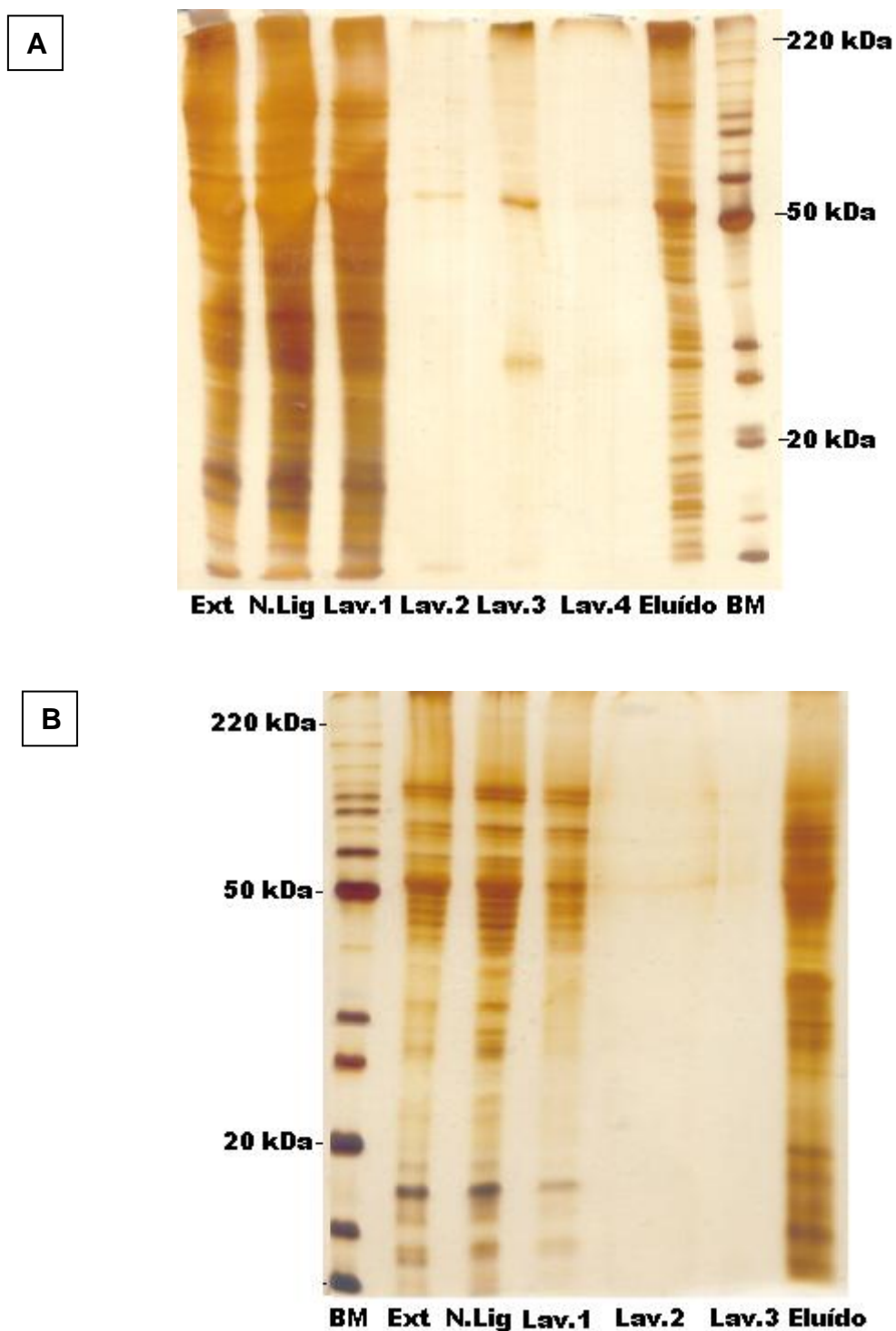


Figura 18. Enriquecimento de Ub recombinante por imunoafinidade. Extratos protéicos de *T. cruzi* em diferentes etapas da imunoafinidade. (A) Imunoafinidade de epimastigotas e (B) epimastigotas estressados. Legenda: BM – Padrão de massa molecular *Bench Mark* (*Invitrogen*); Ext - extrato protéico total de *T. cruzi*; N.Lig - Fração de proteínas não ligadas na resina; Lav.1 a Lav.4. – lavados 1 a 4; Eluído – proteínas eluídas, proteínas ubiquitiladas. Matriz de SDS-PAGE 13% corado com nitrato de prata.

4.8 Enriquecimento de proteínas de interação com Ub

Para identificar as proteínas que interagem com o sinal de ubiquitilação em *T. cruzi*, ensaios de afinidade por Ub foram realizados como descrito anteriormente. Estes ensaios foram realizados com extratos protéicos de epimastigotas (Figura 19) e epimastigotas submetidos a estresse nutricional (Figura 20) de *T. cruzi*.

Os controles negativos mostraram que as proteínas recuperadas na eluição possuíam interação específica com a Ub, e não com a sefarose (Figura 21 B) ou com outros possíveis contaminantes (Figura 21 A). Réplicas biológicas deste experimento foram realizadas e apresentaram o mesmo padrão de proteínas em gel unidimensional SDS-PAGE. Porém a identificação das proteínas foi realizada com apenas uma das réplicas (a mesma apresentada neste trabalho – figuras 19 e 20) devido à quantidade de amostras presentes em cada gel, fator que tornaria inviável a identificação de todas as amostras das réplicas através do equipamento de espectrometria de massas disponível.

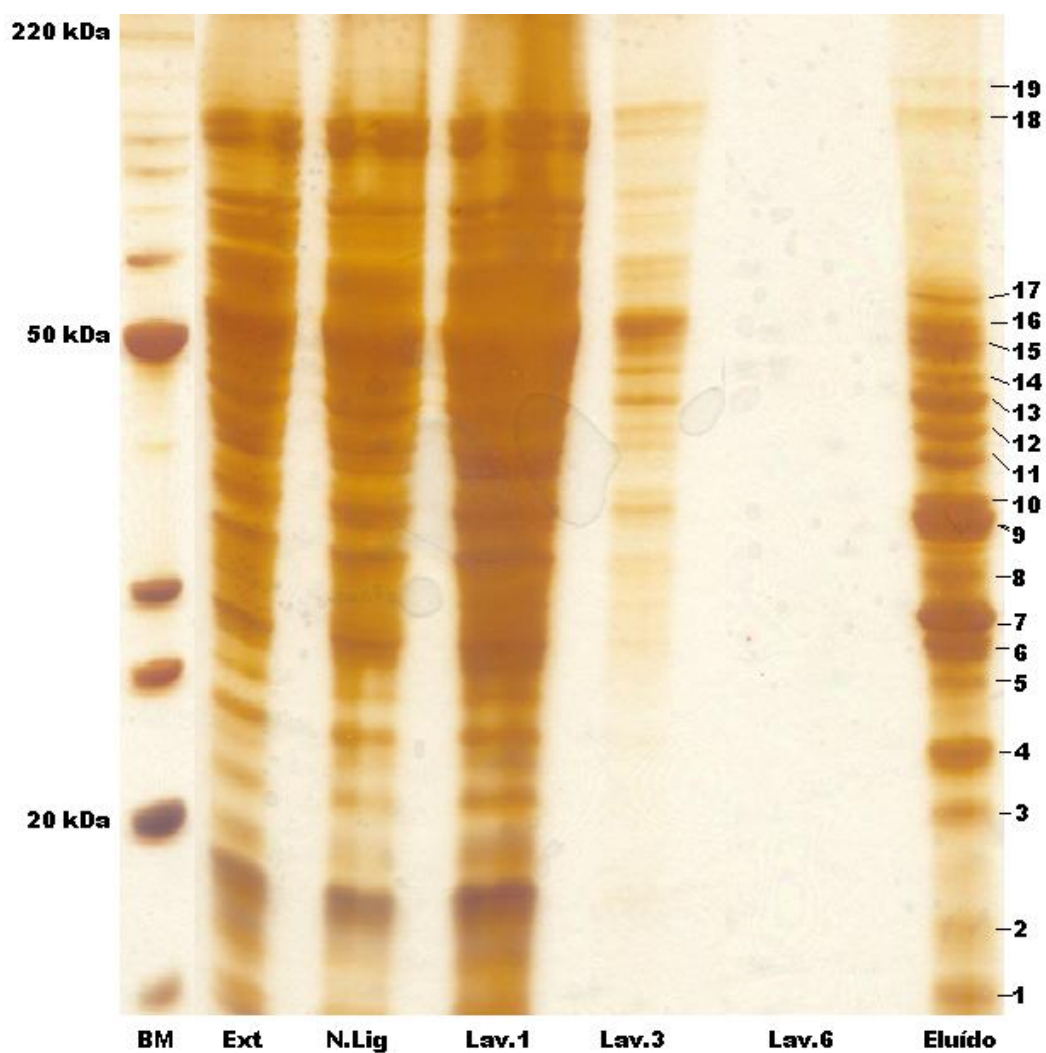


Figura 19. Afinidade de proteínas de epimastigotas por Ub.

As bandas numeradas de 1 a 19 foram retiradas do gel para a identificação em espectrometria de massas. Legenda: BM – Padrão de massa molecular *Bench Mark* (Invitrogen); Ext - extrato protéico total de *T. cruzi*; N.Lig - Fração de proteínas não ligadas na resina; Lav.1 a Lav.6. – lavados 1 a 6; Eluído – proteínas eluídas, de interação com Ub. Matriz de SDS-PAGE 13% corado com nitrato de prata

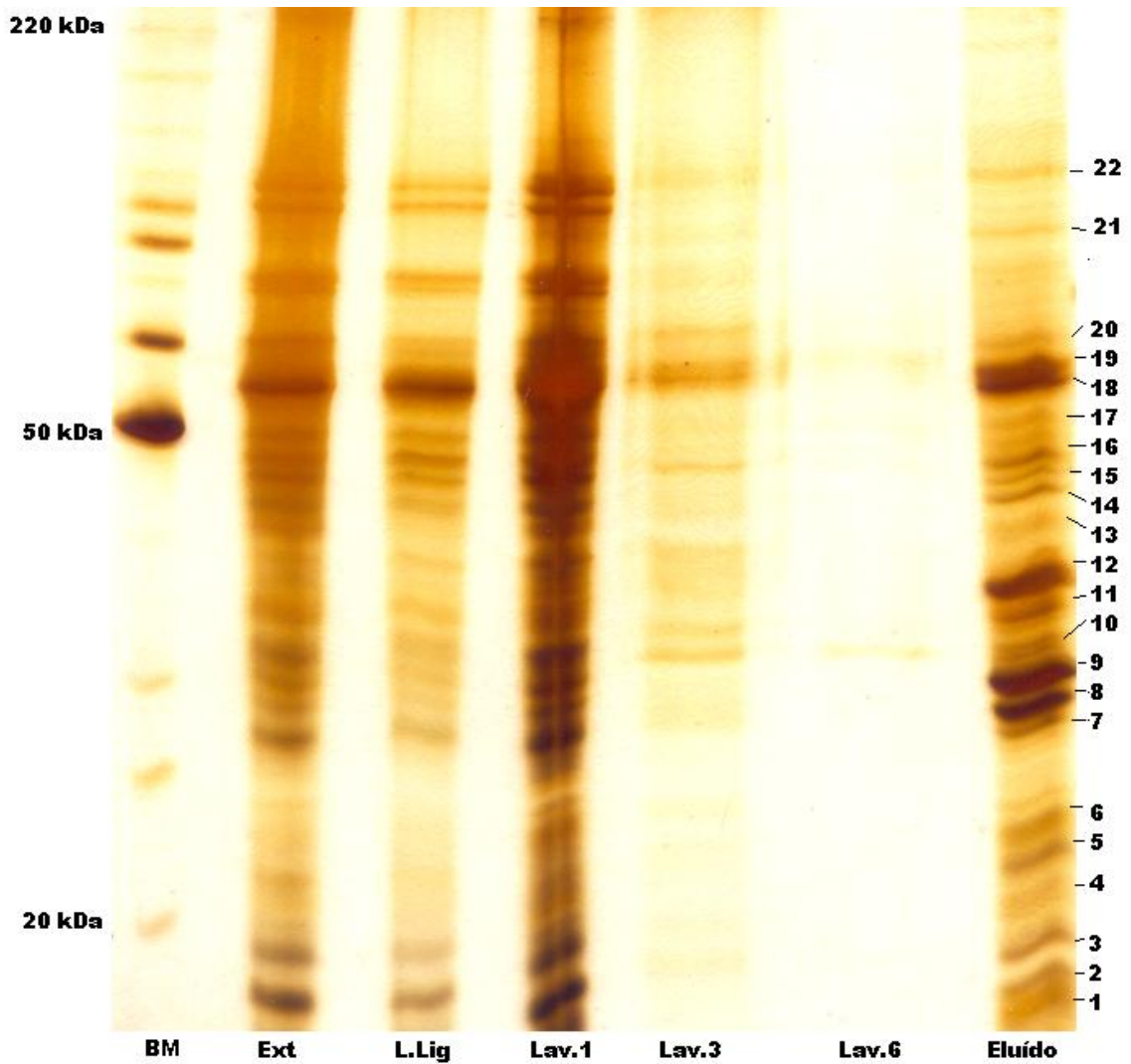
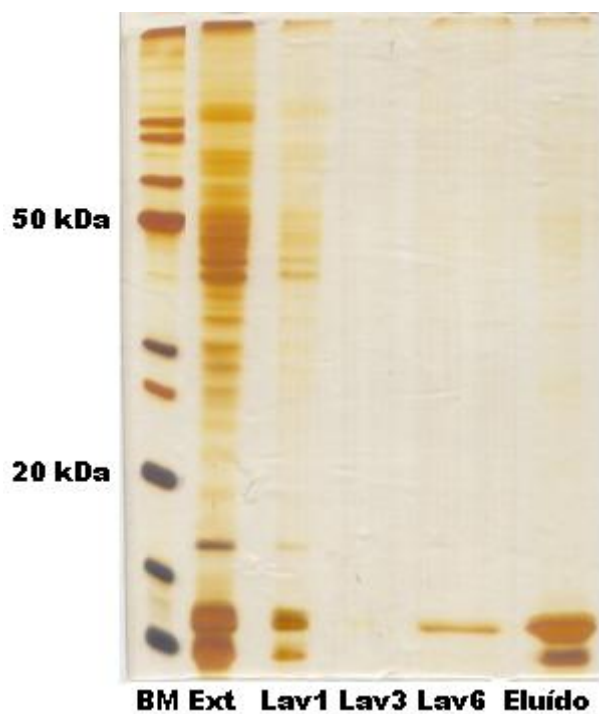


Figura 20. Afinidade de proteínas de epimastigotas estressados por Ub.

As bandas numeradas de 1 a 22 foram retiradas do gel para a identificação em espectrometria de massas. Legenda: BM – Padrão de massa molecular *Bench Mark* (Invitrogen); Ext - extrato protéico total de *T. cruzi*; N.Lig - Fração de proteínas não ligadas na resina; Lav.1 a Lav.6. – lavados 1 a 6; Eluído – proteínas eluídas, de interação com Ub. Matriz de SDS-PAGE 13% corado com nitrato de prata.

A



B

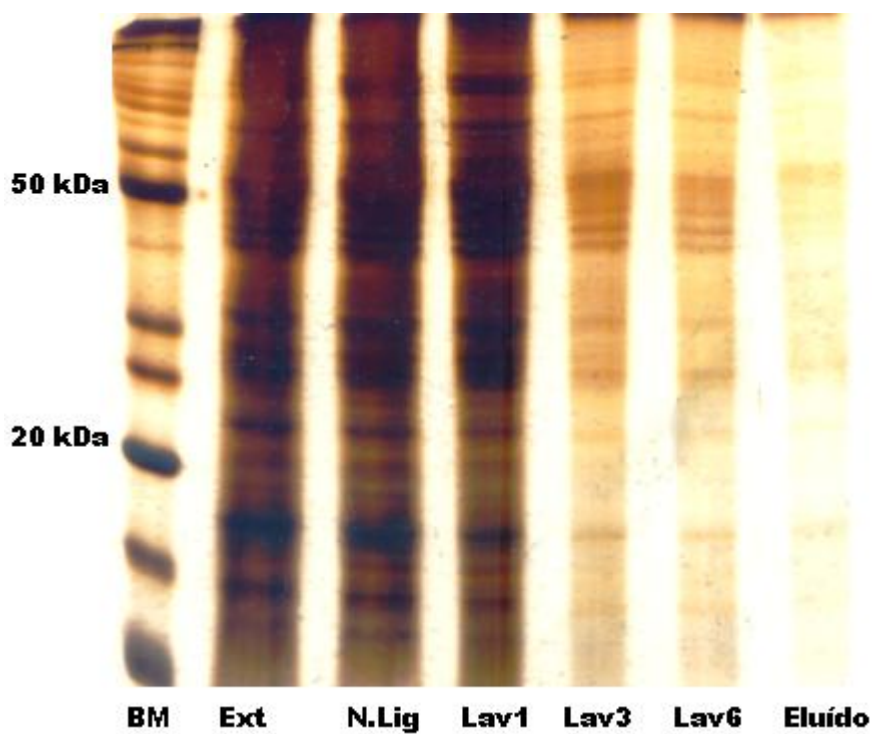


Figura 21. Controles negativos da afinidade por Ub.

(A) Perfil eletroforético de ensaio de competição das proteínas alvos por incubação com Ub recombinante na solução contendo extrato de *T. cruzi*. (B) Perfil eletroforético do resultado da incubação de extrato com sefarose para verificar ligação inespecífica. Legenda: BM – Padrão de massa molecular *Bench Mark* (Invitrogen); Ext - extrato protéico total de *T. cruzi*; N.Lig - Fração de proteínas não ligadas na resina; Lav.1 a Lav.6. – lavados 1 a 6; Eluído – proteínas eluídas. Matriz de SDS-PAGE 13% corado com nitrato de prata.

4.9 Identificação de proteínas de interação com Ub

As proteínas retiradas dos géis mostrados anteriormente foram digeridas e purificadas, como já descrito. Os espectros das fragmentações obtidas em equipamento MALDI-TOF/TOF Autoflex (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) estão representados na figura 22.

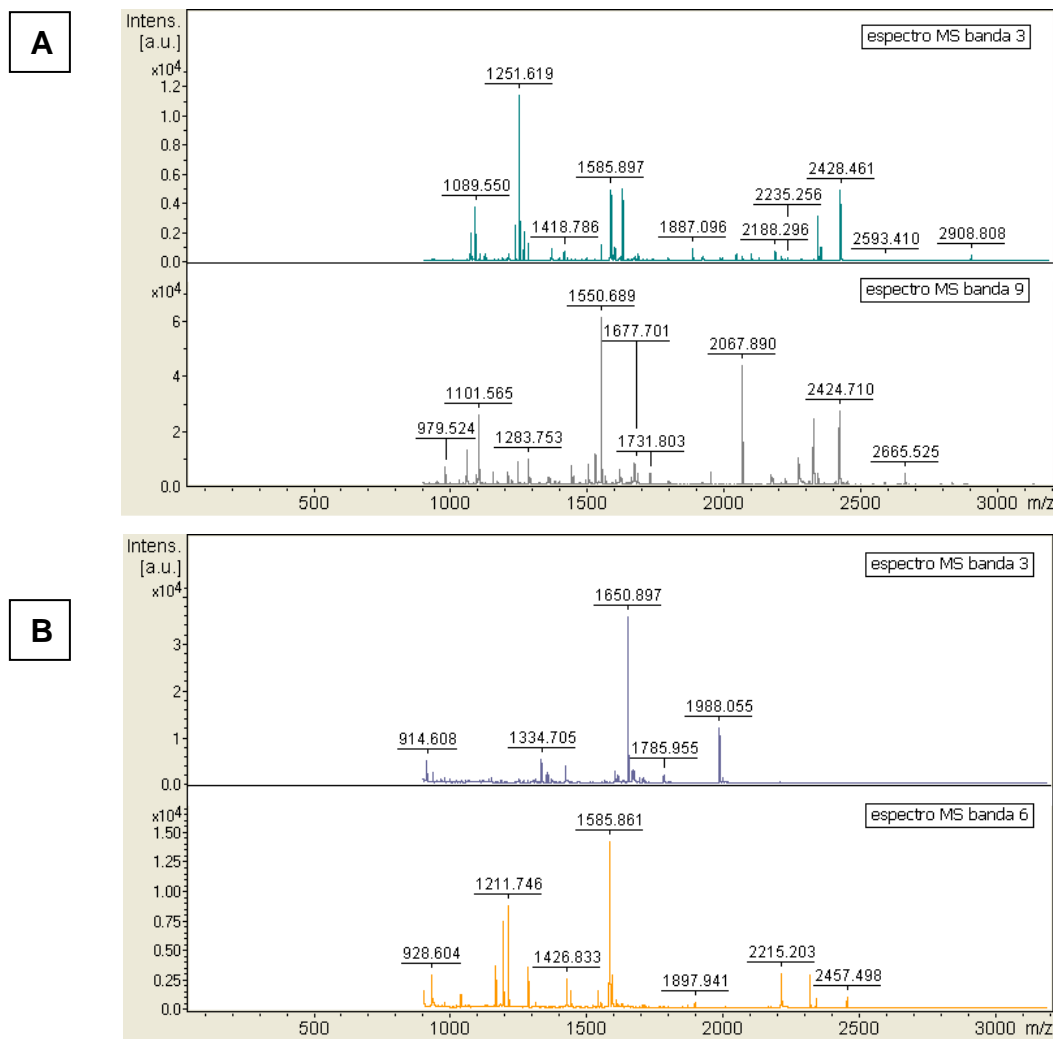


Figura 22. Espectros MS representativos das proteínas purificadas na afinidade por Ub. Espectros das bandas 3 e 9, purificadas de extrato de epimastigotas (A), e bandas 3 e 6, purificadas de extrato de epimastigotas submetidos a estresse (B).

A identificação das proteínas a partir das massas dos espectros gerados foi feita pelo algoritmo de busca Mascot, que identificou as proteínas listadas nas tabelas 6, 7 e 8, de epimastigotas, epimastigotas submetidos à estresse e proteínas compartilhadas entre as 2 fases, respectivamente.

Tabela 6. Lista de proteínas de epimastigotas que possuem interação com Ub, identificadas por espectrometria de massas.

A tabela mostra a banda indicada na imagem do gel (Fig. 19), sua respectiva identificação, taxa de erro da identificação (expect), domínios conhecidos das proteínas hipotéticas e o processo celular no qual as proteínas estão envolvidas.

Banda	Identificação	Valor de p	Domínio (Pfam)	Processo celular / Função molecular
1	8033.t00005_ribose 5-phosphate isomerase, putative	7.8 e-07	Ribose/Galactose Isomerase	Via pentose phosphate, ramificação não-oxidativa
	4859.t00001_hypothetical protein, conserved	2 e-04	Alba	Metabolismo de RNA
2	4718.t00003_hypothetical protein, conserved	7.6 e-02	Não conhecido	
	7052.t00010_40S ribosomal protein S18, putative	4 e-02	Proteína Ribosomal S13/S18	Tradução, constituinte estrutural do ribossomo
3	8128.t00005_small GTP-binding protein, putative	5.8 e-02	Fator ADP-ribosilação	Transporte de vesículas do retículo endoplasmático ao Golgi
	8445.t00002_hypothetical protein, conserved	7.1 e-03	Não conhecido	
6	4764.t00006_hypothetical protein, conserved	8.2 e-02	UBA/TS-N	Interação com o processo de ubiquitilação
7	8314.t00004_haloacid dehalogenase-like hydrolase, putative	4 e-04	haloacid dehalogenase-like hydrolase	Envolvido em diversos processos celulares, desde biossíntese de aminoácidos a detoxificação celular
	7098.t00028_methylthioadenosine phosphorylase, putative	1.2 e-05	Família fosforilase 2	Reciclagem de aminoácidos
9	7146.t00001_cytosolic malate dehydrogenase, putative	3.9 e-02	lactate/malate dehydrogenase, domínio de ligação a NAD	Ciclo de ácidos tricarboxílicos / do ácido ciclo / de Krebs.
	7839.t00021_minichromosome maintenance (MCM) complex subunit, putative	1.4 e-01	Família MCM2/3/5	Início da replicação do DNA

13	7435.t00003_glutamamyl carboxypeptidase, putative / metallo-peptidase, clan MH, family M18, putative	4.5 e-03	Peptidase família M20/M25/M40	Proteólise
	8516.t00004_Acetylornithine deacetylase, putative	1.1 e-02	Peptidase família M20/M25/M40	Proteólise
	8305.t00024_60S ribosomal proteins L24, putative	9.6 e-03	Proteína Ribossomal L24e	Tradução, constituinte estrutural do ribossomo
	6207.t00010_hypothetical protein, conserved	5 e-02	Não conhecido	
14	7117.t00005_2-oxoisovalerate dehydrogenase alpha subunit, putative	2.7 e-04	Dehydrogenase componente E1	Catálise da reação redução-oxidação (redox)
	8728.t00019_eukaryotic initiation factor 4a, putative	3 e-04	DEAD/DEAH box helicase	Atividade de helicase ATP dependente; Ligadora de “cap” de RNA.
17	8462.t00004_hypothetical protein	2.8 e-04	Não conhecido	
	8652.t00011_inosine-5'-monophosphate dehydrogenase, putative	3.6 e-05	IMP dehydrogenase /domínio GMP reductase	Biossíntese de purinas (ribonucleotídeos)
18	6890.t00019_pyruvate phosphate dikinase, putative	4.7 e-05	Domínio de ligação PEP/pyruvate	Fosforilação

Tabela 7. Lista de proteínas de epimastigotas submetidos a estresse que possuem interação com Ub, identificadas por espectrometria de massas.

A tabela mostra a banda indicada na imagem do gel (Fig. 20), sua respectiva identificação, taxa de erro da identificação (expect), domínios conhecidos das proteínas hipotéticas e o processo celular no qual as proteínas estão envolvidas.

Banda	Identificação	Valor de p	Domínio (Pfam)	Processo celular / Função molecular
3	7052.t00014_40S ribossomal protein S10, putative	6.2 e-03	Plectina/S10	Tradução, ligadora de RNA
4	6930.t00008_hipothetical protein, conserved	5.4 e-03	Não conhecido	
10	6931.t00012_V-type ATPase, A subunit, putative	1.7 e-01	ATP sintase família alpha/beta, domínio de ligação nucleotideo	Síntese de ATP
11	4917.t00002_sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, putative	2.7 e-03	Fructose-1-6-bisfosfatase	Gluconeogênese
13	4935.t00030_GTPase protein, putative	7.6 e-02	GTPase de função desconhecida	Ligadora de GTP, hidrolisa GTP
17	2594.t00001_hipothetical protein, conserved	2.6 e-02	Não conhecido	
20	7853.t00017_hipothetical protein, conserved	1.7 e-01	Não conhecido	
	7414.t00029_chaperonin HSP60, mitochondrial precursor	2.9 e-02	TCP-1/cpn60 família chaperonina	Formação de complexos protéicos, interação seletiva com proteínas mal formadas

Tabela 8. Lista de proteínas comuns entre epimastigotas e epimastigotas submetidos a estresse que possuem interação com Ub, identificadas por espectrometria de massas.

A tabela mostra a banda indicada na imagem do gel (Fig. 19/20, respectivamente), sua respectiva identificação, taxa de erro da identificação (expect), domínios conhecidos das proteínas hipotéticas e o processo celular no qual as proteínas estão envolvidas.

Banda	Identificação	Valor de p	Domínio (Pfam)	Processo celular / Função molecular
3/5	5638.t00004_hypothetical protein, conserved	1.6 e-04	Peptidase C56	Proteólise, endopeptidases
4/6	4408.t00001_tryparedoxin peroxidase, putative	3.1 e-08	Família AhpC/TSA	Transporte de elétrons
5/11	8530.t00004_hypothetical protein, conserved	5.8 e-02	Alba	Ligadora de DNA e RNA
12/15	4940.t00004_fructose-bisphosphate aldolase, glycosomal, putative	7.8 e-11	Fructose-bisphosphate aldolase classe-I	Glicólise
13/16	7832.t00005_hypothetical protein, conserved	7.8 e-08	Não conhecido	
15/18	11788.t00001_alpha tubulin, putative	4.6 e-03	Familia tubulin/FtsZ, dominio GTPase	Componente estrutural do citoesqueleto
16/19	6998.t00004_beta tubulin, putative	9.8 e-08	Familia tubulin/FtsZ, dominio GTPase	Componente estrutural do citoesqueleto

5. DISCUSSÃO

Em tripanossomatídeos, o mecanismo de regulação da expressão gênica é feito em grande parte de modo pós-transcricional ou pós-traducional (Elias, 2001). Estes parasitas necessitam adaptar-se rapidamente às transições entre o inseto vetor e o hospedeiro mamífero, fazendo uma reprogramação na expressão de seus genes. Durante este processo, muitas alterações podem estar associadas à degradação e/ou modificação de proteínas estágio-específicas.

Em células eucarióticas, um dos principais processos de modificação de proteínas ocorre através da utilização de uma pequena proteína altamente conservada, a ubiquitina. Esta via, conhecida como ubiquitilação, controla várias funções celulares incluindo a progressão do ciclo celular, transcrição estágio-específica, processos antigênicos e controle de qualidade das proteínas (revisto por Pickart, 2001). Porém pouco se conhece a respeito desta via em tripanossomatídeos, mas acredita-se que ela pode estar regulando diversos processos, inclusive a diferenciação para formas infectivas.

Com a finalidade de compreender como ocorre o reconhecimento do sinal da ubiquitilação em uma célula eucariótica ancestral, como o caso do *T. cruzi*, realizamos ensaios de afinidade por ubiquitina, no qual proteínas que possuem interação com a ubiquitina puderam ser purificadas do extrato protéico de *T. cruzi*. Este ensaio foi feito tanto em sua fase logarítmica de crescimento (epimastigotas com 3 dias de crescimento) quanto em células submetidas a estresse (epimastigotas em fase estacionária de crescimento – 5 dias – submetidas a meio com escassez de nutrientes e alta densidade de parasitas). Estes ensaios foram feitos para verificar se existiam diferenças entre os sinais gerados em condições de estresse.

Outro ensaio adotado para obter informações sobre como a ubiquitilação regula os processos celulares em *T. cruzi* foi o enriquecimento dos alvos da via, ou seja, das proteínas ubiquitiladas. Para tanto, foram usadas as abordagens de transfecção com ubiquitinas recombinantes, fusionadas a diferentes etiquetas moleculares para possibilitar a purificação das mesmas, e ensaios de imunoprecipitação com anti-ubiquitina. Os anticorpos produzidos para

ubiquitina de *T. cruzi* foram produzidos por nossa equipe. Optamos por produzir estes anticorpos devido o fato de os anticorpos contra ubiquitina comercializados reconhecerem a proteína de outras espécies, como humanos. Apesar de a ubiquitina de *T. cruzi* apresentar apenas 3 aminoácidos diferentes quando comparada à de humano, alguns trabalhos sugerem que as mesmas são imunologicamente diferentes (Telles e cols., 1999; Telles e cols, 2003). Esta informação não foi verificada no presente trabalho, pois, ao utilizarmos o anticorpo contra Ub de humanos comercial, além de apresentar reconhecimento pela Ub de *T. cruzi*, o mesmo apresentou padrão muito semelhante ao anti-Ub de *T. cruzi* produzido por nossa equipe.

Antes de realizar qualquer ensaio de enriquecimento de proteínas ubiquitiladas, duas drogas foram testadas, o IAA (iodoacetamida) e PSI que são inibidores de DUB e proteassomo, respectivamente. Na figura 15 A é notável o aumento de conjugados ubiquitilados quando os parasitas são submetidos à duas drogas em conjunto. Quando são submetidos apenas a IAA, ocorre um leve aumento desses conjugados. O mesmo ocorre com o PSI, indicando que é preferível realizar a inibição de ambos para obter uma maior acumulação de conjugados ubiquitilados. Este dado já era esperado, pois, quando apenas o proteassomo é inibido, as DUB ainda estão atuando na remoção de Ub da proteínas ubiquitiladas, e que não estão sendo degradadas pelo proteassomo como deveriam, na tentativa de manter o equilíbrio na célula. O mesmo ocorre quando apenas DUB são inibidas, o proteassomo ainda continua degradando algumas proteínas ubiquitiladas, independente da atuação ou não das DUB. Outra informação relevante contida neste resultado é a observação de uma maior acumulação de proteínas ubiquitiladas ao inibir apenas as DUBs quando comparadas à acumulação que ocorre ao inibir apenas o proteassomo. Este dado pode ser explicado devido aos diferentes destinos que a ubiquitilação pode ter, destinos estes que muitas vezes não são dependentes de degradação via proteassomo (Mukhopadhyay e Riezman, 2007).

Os ensaios de enriquecimento de proteínas ubiquitiladas através da purificação de transfectantes não foram conclusivos, pois as técnicas abordadas necessitavam um melhor nível de padronização, o que tornaria inviável o término do presente trabalho no prazo estabelecido (2 anos). Os

transfectantes foram congelados à -80 °C para que os ensaios sejam retomados futuramente. Já os ensaios de imunoprecipitação de proteínas ubiquitiladas apresentaram bons resultados, e a técnica está bem padronizada. Tais amostras serão submetidas a espectrometria de massas para identificação das mesmas.

As proteínas de interação com ubiquitina apresentaram um alto nível de purificação devido as intensas lavagens com altas concentrações de sal. Tal abordagem de lavagem foi adotada para tentar minimizar ao máximo os possíveis contaminantes, porém, com isso, proteínas de fraca interação não puderam ser recuperadas, podendo ser o caso das enzimas envolvidas no processo da ubiquitilação. Mas como o objetivo do trabalho era identificar proteínas que interagem com a ubiquitilação, esta abordagem foi suficiente pois, de acordo com os controles aplicados, as proteínas recuperadas tinham interações específicas com a Ub.

Outro fator restritivo que pode ser usado como explicação para a não identificação de enzimas da via neste ensaio é a baixa sensibilidade do aparelho de espectrometria utilizado no presente trabalho, que não pôde detectar diversas amostras de proteínas retiradas do gel.

Apesar disso, foram identificadas proteínas que, de acordo com trabalhos publicados, podem estar regulando processos ou sendo reguladas pela ubiquitilação, a partir de sua interação com a via. É o caso de proteínas ligadoras de DNA e RNA, que desempenham diferentes funções como reparo de DNA, condensação da cromatina, controle da expressão gênica, entre diversas outras funções. Inúmeros trabalhos têm sido publicados no últimos 20 anos mostrando o envolvimento da ubiquitilação nestes processos celulares, ubiquitilando proteínas cromossomais (Daniel e cols., 2004; Hoege e cols., 2002; revisto por Muratani e Tansey, 2003) ou adaptadores de ligação com RNA (Gwizdek e cols., 2006; Hobeika e cols., 2007). Sabe-se também que domínios de interação com Ub são encontrados em proteínas ligadoras de RNA, como os fatores de exportação Mex67 (Hobeika e cols., 2007), onde provavelmente estão regulando exportação ou meia-vida das moléculas de RNA, e também em proteínas ligadoras de DNA (Acharya e cols., 2008), como em DNA polimerases responsáveis pela síntese de translesão, ou seja, responsáveis pela replicação quando existe danos no DNA, e existem fortes

evidências que estas polimerases são recrutadas ao local do dano através de seu domínio de ligação à Ub (Acharya e cols., 2008).

Algumas proteínas ligadoras de DNA e RNA foram encontradas em nossas análises. Uma das proteínas hipotéticas encontradas possui domínio Alba, que são domínios primeiramente descritos em arqueobactérias com função de cobrir densamente o DNA sem compactá-lo (Bell e cols., 2002), mas em eucariotos tem apresentado funções diferentes, como no metabolismo de RNA (Aravind e cols., 2003).

Outra proteína ligadora de DNA encontrada foi uma subunidade do complexo de manutenção do cromossomo (Mcm) que está envolvida tanto nos passos de iniciação quanto de polimerização da replicação do DNA em eucariotos, e sabe-se que esta proteína é regulada durante o processo do ciclo celular pela ubiquitilação da mesma (Braun e Breeden, 2007). Como já descrito anteriormente, o processo de interação com Ub por domínios de ligação de Ub pode estar atuando em conjunto com a modificação das proteínas que contém tais domínios em um processo conhecido como ubiquitilação acoplada (Woelk e cols., 2006), sendo assim uma proteína que interage com a sinalização gerada pela ubiquitilação pode também estar ubiquitilada, tornando necessário um estudo mais aprofundado para identificar se tal processo realmente acontece no *T. cruzi*.

O fator de iniciação eucariótico 4a, identificado no presente trabalho, possui um domínio de helicase de RNA conhecido como DEAD ou DEAH, e alguns membros dessa família também podem atuar na maturação de RNA ribossomais e na biogênese de ribossomos (Kossen e Uhlenbeck, 1999). A proteína nuclear p63 possui um domínio DEAD RNA helicase e trabalhos recentes demonstraram que a SUMOilação desta proteína é essencial para regular sua atividade, inibir a interação e coativação de p53 e alterar o estado da cromatina através do recrutamento de deacetilases de histonas (Jacobs e cols., 2007; revisto por Fuller-Pace e cols., 2007). Uma GTPase também foi identificada como sendo uma proteína de interação com Ub pelo nosso estudo. As Ran GTPase são proteínas que também são modificadas por SUMO, elas são pequenas GTPase envolvidas na importação nuclear e são modificadas para serem enviadas ao complexo do poro nuclear (Matunis e cols., 1996). SUMOilação e ubiquitilação são modificações bastante interligadas, sendo, em

muitos casos, reguladas uma pela outra (Desterro e cols., 1998; revisto por Welchman e cols., 2005). Talvez por esse motivo tenham sido encontradas proteínas que, em diferentes organismos, são modificadas por SUMO, mas podem estar sendo reguladas ou regulando proteínas modificadas por ubiquitina, através do reconhecimento e interação entre as mesmas.

Subunidades ribossomais também foram encontradas em nossas análises, como as subunidades S10 e S18 do complexo ribossomal 40S e a subunidade L24 constituinte do complexo ribossomal 60S. A primeira subunidade está relacionada com reconhecimento de RNA, a segunda e terceira são partes estruturais do ribossomo.

Foi identificada também uma proteína hipotética com um domínio UBA, um domínio de associação com Ub. Tal identificação era esperada já que este domínio é bem caracterizado por interagir com Ub (Madura, 2002).

Diversas peptidases foram encontradas, porém o envolvimento destas com a modificação por Ub não está claro, apesar de um dos principais destinos das proteínas modificadas por Ub ser a degradação. Nenhuma das peptidases encontradas fazem parte do complexo proteolítico proteassomo, e nem estão relacionadas às DUB até o momento.

Também foram identificadas proteínas envolvidas em vias metabólicas distintas como via das pentoses, ciclo de Krebs, metabolismo de piruvato e biossíntese de purinas e ATP. A crescente quantidade de trabalhos demonstrando o envolvimento da ubiquitilação em processos celulares cada vez menos esperados faz da identificação de tais proteínas um resultado não muito surpreendente, mesmo assim, validações destes resultados ainda são necessárias.

Posteriores ensaios ainda deverão ser realizados para confirmação dos dados obtidos até o momento, como a realização de espectrometria de massas em um aparelho mais sensível que possa identificar proteínas que não foram identificadas no MALDI-TOF. Além disso outros tipos de ensaios deverão ser realizados, como o duplo-híbrido utilizando a Ub como isca para a identificação de interações mais específicas. Tais confirmações são necessárias pois, entre as proteínas identificadas no presente trabalho, algumas são proteínas bastante abundantes em *T. cruzi* e já foram identificadas em outros trabalhos de proteômica, inclusive em trabalhos envolvendo imunoprecipitação, como no

caso da proteína alba. Ainda assim os resultados obtidos neste trabalho são confiáveis devido ao cuidado utilizado tanto na estringência das lavagens quanto nos controles negativos aplicados. Outro fator que confere credibilidade aos dados apresentados é a identificação de uma proteína que possui domínio UBA de interação com Ub, entre outras proteínas que, a interação das mesmas com o sistema de ubiquitilação é conhecida e classicamente aceita.

A identificação das proteínas alvo da ubiquitilação (proteínas ubiquitiladas) também pode elucidar diversas questões que ainda não foram respondidas com o presente trabalho, como quais são as proteínas modificadas durante a diferenciação do organismo e se a ubiquitilação desempenha um papel tão importante em *T. cruzi* quanto tem desempenhado em outros eucariotos.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados expostos nesta dissertação de mestrado, concluímos que:

- A maior parte dos objetivos propostos no início do trabalho foi concluída.
- Proteínas que interagem com Ub em *T. cruzi* foram identificadas com confiabilidade. Muitas destas já foram descritas em outros organismos como proteínas que estão envolvidas no processo de ubiquitilação, sendo alvos do mesmo ou interagindo com ele.
- Entre as proteínas que interagem com a Ub em *T. cruzi*, estão algumas importantes para o processo de tradução. Esta observação permite inferir um provável envolvimento do sistema de ubiquitilação na regulação da expressão protéica em *T. cruzi*, regulando fatores de início da tradução, ou estabilidade do complexo ribossomal.
- Apesar das proteínas-alvo da ubiquitilação não terem sido identificadas, as ferramentas fundamentais para esta finalidade foram criadas, bem como, todas as padronizações referentes ao enriquecimento das proteínas ubiquitiladas já foram estabelecidas.

7. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos nesta dissertação oferecem novas perspectivas para o estudo da via UPS em *T. cruzi*:

- Buscar domínios de ligação de Ub nas proteínas identificadas neste trabalho.
- Identificar os alvos da via de ubiquitilação em *T. cruzi* e verificar a sua diversidade durante a metaciclogênese. Deste modo, é provável que seja possível conhecer proteínas preferencialmente modificadas em pontos específicos da diferenciação deste parasita, podendo contribuir para o esclarecimento de questões sobre os mecanismos que regulam este processo.
- Corroborar os resultados obtidos neste trabalho através de outros ensaios de interação disponíveis, como a purificação por *TAP*-tag ou ensaios de duplo-híbrido. Além disso, realizar nova espectrometria de massas com as amostras geradas neste trabalho, em aparelho mais sensível.
- Caracterizar os elementos da via de ubiquitilação em *T. cruzi*, as enzimas atuantes e os alvos das mesmas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHARYA, N.; YOON, J. H.; GALI, H.; UNK, I.; HARACSKA, L.; JOHNSON, R. E.; HURWITZ, J.; PRAKASH, L.; PRAKASH, S. Roles of PCNA-binding and ubiquitin-binding domains in human DNA polymerase ϵ in translesion DNA synthesis. **Proc Natl Acad Sci.** v. 105, n.46, p. 17724-17729. 2008.
- AJIOKA, J.; SWINDLE, J. The calmodulin-ubiquitin associated genes of *Trypanosoma cruzi*: their identification and transcription. **Mol Biochem Parasitol.** v. 57, n. 1, p. 127-136. 1993.
- AJIOKA, J.; SWINDLE, J. The calmodulin-ubiquitin (CUB) genes of *Trypanosoma cruzi* are essential for parasite viability. **Mol Biochem Parasitol.** v. 78, n. 1-2, p. 217-225. 1996.
- AMERIK AY, HOCHSTRASSER M. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. **Biochim Biophys Acta.** v. 1695, n. 1-3, p. 189-207. 2004.
- ARAVIND, L.; IYER, L. M.; ANANTHARAMAN, V. The two faces of Alba: the evolutionary connection between proteins participating in chromatin structure and RNA metabolism. **Genome Biol.** v. 4, n. 10, p. R64. 2003.
- ARAVIND, L.; KOONIN, E. V.; The U-box is a modified RING finger – a common in ubiquitination. **Curr Biol.** v. 10, n. 4, p. 132-134. 2000.
- ASHER, G.; BERCOVICH, Z.; TSVETKOV, P.; SHAUL, Y.; KAHANA, C. 20S proteasomal degradation of ornithine decarboxylase is regulated by NQO1. **Mol. Cell.** v. 17, p. 645-655. 2005.
- ÁVILA, A.R.; YAMADA-OGATTA, S.F.; DA SILVA MONTEIRO, V.; KRIEGER, M.A. NAKAMURA, C.V.; DE SOUZA, W.; GOLDENBERG, S. Cloning and characterization of the metacyclogenin gene, which is specifically, expressed during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 117, n. 2, p. 169-170. 2001.
- BABOSHINA, O. V.; HAAS, A. L. Novel multiubiquitin chain linkages catalyzed by the conjugating enzymes E2EPF and RAD6 are recognized by 26 S proteasome subunit 5. **J. Biol. Chem.** v. 271, n. 5, p. 2823-2831. 1996.
- BACKER, R.T.; BOARD, P. G. The human ubiquitin-52 amino acid fusion protein gene shares several structural features with mammalian ribosomal protein genes. **Nucleic Acids Research.** v. 19, n. 5, p. 1035-1040. 1991.
- BARRETO, M. P. Epidemiologia. Em: Zigman Brener, Zilton Andrade. **Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979. p 89-291.

- BARRIO, A. B.; VAN VOORHIS, W. C.; BASOMBRÍO, M. A. Trypanosoma cruzi: attenuation of virulence and protective immunogenicity after monoallelic disruption of the cub gene. **Exp Parasitol.** v. 117, n. 4, p. 382-389. 2007.
- BAYER, P.; ARNDT, A.; METZGER, S.; MAHAJAN, R.; MELCHIOR, F.; JAENICKE, R.; BECKER J. Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. **J Mol Biol.** v. 280, n. 2, p. 275-86. 1998.
- BELL, S. D.; BOTTING, C. H.; WARDLEWORTH, B. N.; JACKSON, S. P.; WHITE, M. F. The interaction of Alba, a conserved archaeal chromatin protein, with Sir2 and its regulation by acetylation. **Science.** v. 296, n. 5565, p. 148-151. 2002.
- BELLARE, P.; KUTACH, A. K.; RINES, A. K.; GUTHRIE, C.; SONTHEIMER, E. J. Ubiquitin binding by a variant Jab1/MPN domain in the essential pre-mRNA splicing factor Prp8p. **RNA.** v. 12, n. 2, p. 292-302. 2006.
- BIENKO, M.; GREEN, C. M.; CROSETTO, N.; RUDOLF, F.; ZAPART, G.; COULL, B.; KANNOUCHE, P.; WIDER, G.; PETER, M.; LEHMANN, A. R.; HOFMANN, K.; DIKIC, I. Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis. **Science.** v. 310, n. 5755, p. 1821-1824. 2005.
- BOHNSACK, R. N.; HAAS, A. L. Conservation in the mechanism of Nedd8 activation by the human AppBp1-Uba3 heterodimer. **J Biol Chem.** v. 278, n. 29, p. 26823-26830. 2003.
- BONALDO, M.C., SOUTO-PADRON, T., DE SOUZA, W., GOLDENBERG, S. Cell substrate adhesion during Trypanosoma cruzi differentiation. **The Journal of the Cell Biology.** v. 106, p. 1349-1358. 1988.
- BOUTET, S.C.; DISATNIK, M.H.; CHAN, L.S.; IORI, K.; RANDO, T.A. Regulation of Pax3 by proteasomal degradation of monoubiquitinated protein in skeletal muscle progenitors. **Cell.** v. 130, p. 349-362. 2007.
- BRAUN, K. A.; BREEDEN, L. L. Nascent transcription of MCM2-7 is important for nuclear localization of the minichromosome maintenance complex in G1. **Mol Biol Cell.** v. 18, n. 4, p. 1447-1456. 2007.
- BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annual Review of Microbiology.** v. 27, p. 347-382. 1973.
- BRENER, Z; ANDRADE, Z. (eds.). **Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas.** Editora Guanabara Koogan, p 1-41, 1979.
- BURNETT, B.; LI, F.; PITTMAN, R. N. The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin-3 binds polyubiquitylated proteins and has ubiquitin protease activity. **Hum Mol Genet.** v. 12, n. 23, p. 3195-3205. 2003.

- CAMARGO, E. P. GROWTH AND DIFFERENTIATION IN TRYPANOSOMA CRUZI. I. ORIGIN OF METACYCLIC TRYPANOSOMES IN LIQUID MEDIA. **Rev Inst Med Trop.** v. 12, p. 93-100. 1964.
- CARDOSO, J.; SOARES, M. J.; MENNA-BARRETO, R. F.; LE BLOAS, R.; SOTOMAIOR, V.; GOLDENBERG, S.; KRIEGER, M. A. Inhibition of proteasome activity blocks *Trypanosoma cruzi* growth and metacyclogenesis. **Parasitol Res.** v. 103, n. 4, p. 941-951. 2008.
- CHAGAS, C. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova morbidade do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 1, p. 159-218. 1909.
- AMATO NETO, V.; CHIEFFI, P. P.; NISIDA, I. V. V.; UMEZAWA, E. S.; SABINO, E. C.; RUOCCO, R. M. S. A.; LOPES, M. H.; DIAS, J. C. P. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi*. **Rev. med.** v. 79, n. 1, p. 12-26. 2000.
- CHOMCZYNSKI P, SACCHI N. Single-step method of RNA isolation by Acid Guanidinium thiocyanate – Phenol – Chloroform extraction. **Analytical Biochemistry.** v. 162, p. 156-159. 1987.
- CHUNG, SH.; SWINDLE, J. Linkage of the calmodulin and ubiquitin loci in *Trypanosoma cruzi*. **Nucleic Acids Res.** v. 18, n. 15, p. 4561-4569. 1990.
- CHUNG, W. L.; LEUNG, K. F.; CARRINGTON, M.; FIELD, M. C. Ubiquitylation is required for degradation of transmembrane surface proteins in trypanosomes. **Traffic.** v. 9, n. 10, p. 1681-1697. 2008.
- CIECHANOVER, A.; HOD, Y.; HERSHKO, A. A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 81, p. 1100-1105. 1978.
- CIECHANOVER, A.; HELLER, H.; ELIAS, S.; HAAS, A.L.; HERSHKO, A. ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 77, p. 1365-1368. 1980.
- CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. **The EMBO Journal.** v. 17, n. 24, p. 7151-7160. 1998.
- CIECHANOVER, A.; BEN-SAADON, R. N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in. **TRENDS in Cell Biology.** v. 14, n. 3, p. 103-106. 2004.
- CLAMP, M.; CUFF, J.; SEARLE, S. M.; BARTON, G. J. The Jalview Java alignment editor. **Bioinformatics.** v. 20, n. 3, p. 426-427. 2004.
- CONTRERAS, V. T.; SALLES, J. M.; THOMAS, N.; MOREL, C. M.; GOLDENBERG, S. *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under

- chemically defined conditions. **Mol Biochem Parasitol.** v. 16, p. 315-327. 1985.
- CONTRERAS, V. T.; ARAUJO-JORGE, T. C.; BONALDO, M. C.; THOMAZ, N.; BARBOSA, H. S.; MEIRELLES, M. N.; GOLDENBERG S. Biological aspects of the DM 28C clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. **Mem. do Inst. Oswaldo Cruz.** v. 83, n. 1, p. 123-133. 1988.
- CONTRERAS, V. T., NAVARRO, M. C., DE LIMA, A. R., DURAN, F., ASKUE, J., FRANCO, Y. Production of amastigotes from metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 97, n. 8, p. 1213-1220. 2002.
- COURA, J. R.; NOGUEIRA, E. S; SILVA, J. R. Índices de transmissão da doença de Chagas por transfusão de sangue de doadores na fase crônica da doença. **O Hospital.** v. 69, p. 115-122. 1966.
- DALLAGIOVANNA, B; PLAZANET-MENUT, C; OGATTA, S. F; ÁVILA, A.R; KRIEGER, M. A; GOLDENBERG, S. *Trypanosoma cruzi*: a gene family encoding chitinbinding-like proteins is posttranscriptionally regulated during metacyclogenesis. **Exp. Parasitol.** v. 99, n. 1, p. 7-16. 2001.
- DANIEL, J.A.; TOROK, M.S.; SUN, Z.W.; SCHIELTZ D.; ALLIS C.D.; YATES JR 3RD; GRANT P.A. Deubiquitination of histone H2B by a yeast acetyltransferase complex regulates transcription. **J Biol Chem.** v. 279, n. 3, p. 1867-71. 2004.
- DE DIEGO, J. L.; KATZ, J. M.; MARSHALL P.; GUTIÉRREZ B.; MANNING J. E.; NUSSENZWEIG V.; GONZÁLEZ J. The Ubiquitin-Proteasome Pathway Plays an Essential Role in Proteolysis during *Trypanosoma cruzi* Remodeling. **Biochemistry.** v. 40, n. 4, p. 1053-1062. 2001.
- DE SOUZA, W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **International Review of Cytology.** v. 86, p. 197-285. 1984.
- DESTERRO, J. M.; RODRIGUEZ, M. S.; HAY, R. T. SUMO-1 modification of I κ B α inhibits NF- κ B activation. **Mol Cell.** v. 2, n. 2, p. 233-239. 1998.
- DIAS, J.C.P. Epidemiologia. Em: Zigman Brener, Zilton Andrade e Manoel Barral- Neto. **Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p 48-74.
- DIETRICH, P.; SOARES, M.B.; AFFONSO, M.H.; FLOETER-WINTER, L.M. The *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA-encoding gene: analysis of promoter and upstream intergenic spacer sequences. **Gene.** v. 1, n. 125, p. 103-107. 1993.

- DONALDSON, K. M.; YIN, H.; GEKAKIS, N.; SUPEK, F.; JOAZEIRO, C. A. Ubiquitin signals protein trafficking via interaction with a novel ubiquitin binding domain in the membrane fusion regulator, Vps9p. **Curr Biol.** v. 13, n. 3, p. 258-262. 2003.
- ELIAS, M. C.; MARQUES-PORTO, R.; FREYMÜLLER, E.; SCHENKMAN, S. Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation. **Mol Biochem Parasitol.** v. 112, n. 1, p. 79-90. 2001.
- EL-SAYED, N.M.; MYLER, P.J.; BARTHOLOMEU, D.C. *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi* etiologic agent of Chagas disease. **Science.** v. 309, n. 5733, p. 409-415. 2005.
- FIGUEIREDO-PEREIRA, M. E; BERG, K. A; WILK, S. A New Inhibitor of the Chymotrypsin-Like Activity of the Multicatalytic Proteinase Complex (20S Proteasome) Induces Accumulation of Ubiquitin-Protein Conjugates in a Neuronal Cell. **Journal of Neurochemistry.** v. 63, p. 1578-1581. 1994.
- FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 81, p. 755-759. 1987.
- FLICK, K.; OUNI, I.; WOHLSCHLEGEL, J. A.; CAPATI, C.; MCDONALD, W. H.; YATES, J. R.; KAISER, P. Proteolysis-independent regulation of the transcription factor Met4 by a single Lys 48-linked ubiquitin chain. **Nat Cell Biol.** v. 6, n. 7, p. 634-641. 2004.
- FRAGOSO, S.P.; GOLDENBERG, S. Cloning and characterization of the gene encoding *Trypanosoma cruzi* DNA topoisomerase II. **Mol Biochem Parasitol.** v. 55, n. 1-2, p. 127-134. 1992.
- FRAGOSO, S.P; PLAZANET-MENUT, C; CARREIRA, M.A; MOTTA, M.C; DALLAGIOVANNA, B; KRIEGER, M.A; GOLDENBERG, S. Cloning and characterization of a gene a putative protein associated with U3 small nucleolar ribonucleoprotein in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 126, n. 1, p. 113-117. 2003.
- FORRATINI, O. P. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. **Rev S Públ.** v. 14, p. 285-299. 1980.
- FULLER-PACE, F. V.; JACOBS, A. M.; NICOL, S. M. Modulation of transcriptional activity of the DEAD-box family of RNA helicases, p68 (Ddx5) and DP103 (Ddx20), by SUMO modification. **Biochem Soc Trans.** v. 35(Pt 6), p. 1427-1429. 2007.
- GLICKMAN, M.H.; RUBIN, D.M.; COUX, O.; WEFES, I.; PFEIFER, G.; CJEKA, Z.; BAUMEISTER, W.; FIRED, V.A.; FINLEY, D. A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation

- and related to the COP9-signalosome and eIF3. **Cell**. v. 94, n. 5, p. 615-623. 1998.
- GLICKMAN, M. H., CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. **Physiol Rev**. v. 82, p. 373-428. 2002.
- GLICKMAN, M.H.; RAVEH, D. Proteasome plasticity. **FEBS Lett**. v. 579, n. 3214-3223. 2005.
- GOLDENBERG, S., CONTRERAS, V.T., e cols. Facts and hypothesis on *Trypanosoma cruzi* differentiation. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 79, n. 39-44. 1984.
- GOLDKNOPF, I. A.; BUSCH, H. Isopeptide linkage between nonhistone and histone 2A polypeptides of chromosomal conjugate-protein A24. **Proc. Natl. Acad. Sci**. v. 74, p. 864-868. 1977.
- GOLDSTEIN, G., SCHEID, M., HAMMERLING, U., BOYSET, E.A., SCHLESINGER, D.H., NIAL, H.D.. Isolation of a Polypeptide That Has Lymphocyte-Differentiating Properties and Is Probably Represented Universally in Living Cells. **PNAS**. v. 72, n. 1, p. 11-15. 1975.
- GOLDSTEIN, G., SCHLESINGER, D.H. Molecular conservation of 74 amino acid sequence of ubiquitin between cattle and man. **Nature**. v. 255, p. 423-424. 1975.
- GONZÁLEZ, J., RAMALHO-PINTO, F.J., FREVERT, U., GHISO, J., TOMLINSON, S., SCHARFSTEIN, J., COREY, E.J., NUSSENZWEIG, V. Proteasome activity is required for the stage specific transformation of a protozoan parasite. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 184, p. 1909-1918. 1996.
- GROSSMAN, S. R.; DEATO, M. E.; BRIGNONE, C.; CHAN, H. M.; KUNG, A. L.; TAGAMI, H.; NAKATANI, Y.; LIVINGSTON, D. M. Polyubiquitination of 53 by a ubiquitin ligase activity of p300. **Science**. v. 300, n. 5617, p. 342-344. 2003.
- GUIMARÃES, A.C. Cardiopatia Crônica: Insuficiência cardíaca. Em: Dias, J.C.P.; Coura, J.R. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas**. Uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: Fiocruz Editora, 1997.
- GWIZDEK, C.; IGLESIAS, N.; RODRIGUEZ, M. S.; OSSAREH-NAZARI, B.; HOBEIKA, M.; DIVITA, G.; STUTZ, F.; DARGEMONT, C. Ubiquitin-associated domain of Mex67 synchronizes recruitment of the mRNA export machinery with transcription. **Proc Natl Acad Sci**. v. 103, n. 44, p. 16376-16381. 2006.

- HAAS, A.L.; ROSE, I.A. The mechanism of ubiquitin activating enzyme. A kinetic and equilibrium analysis. **J. Biol. Chem.** v. 257, p. 10329-10337. 1982.
- HAGLUND, K.; DIKIC, I. Ubiquitylation and cell signaling. **The EMBO Journal.** v. 24, n. 19, p. 3353-3359. 2005
- HAMES, B. D.; RICKWOOD, D. **Gel Electrophoresis of Proteins.** 2^a edição, 1990.
- HATAKEYAMA, S.; YADA, M.; MATSUMOTO, M.; ISHIDA, N.; NAKAYAMA, KI. U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. **J Biol Chem.** v. 276, n. 35, p. 33111-33120. 2001.
- HELLIWELL, S. B.; LOSKO, S.; KAISER, C. A. Components of a ubiquitin ligase complex specify polyubiquitination and intracellular trafficking of the general amino acid permease. **J Cell Biol.** v. 153, n. 4, p. 649-662. 2001.
- HENRIQUEZ, D. A.; PEREZ, N.; PANCE, A.; BRADLEY, C. Mechanisms of protein degradation in *Trypanosoma cruzi*. **Biol Res.** v. 26, n. 1-2, p. 151-157. 1993.
- HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A.; HELLER, H.; HAAS, A. L.; ROSE, I. A. Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 77, p. 1783-1786. 1980.
- HERSHKO, A.; HELLER, H.; ELIAS, S.; CIECHANOVER, A. Components of ubiquitin protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. **J. Biol. Chem.** v. 258, p. 8206-8214. 1983.
- HERSHKO, A., CIECHANOVER, A. The Ubiquitin System. **Annual Review of Biochemistry.** v. 67, p. 425–479. 1998.
- HICKE, L.. Protein regulation by monoubiquitin. **Nature Reviews, Molecular Cell Biology.** v. 2, n. 3, p. 195-201. 2001.
- HICKE, L.; DUNN, R. Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. **Annu Rev Cell Dev Biol.** v. 19, p. 141-172. 2003.
- HICKE, L.; SCHUBERT, H. L.; HILL, C. P. Ubiquitin-binding domains. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v. 6, n. 8, p. 610-621. 2005.
- HIRANO, S.; KAWASAKI, M.; URA, H.; KATO, R.; RAIBORG, C.; STENMARK, H.; WAKATSUKI, S. Double-sided ubiquitin binding of Hrs-UIP in endosomal protein sorting. **Nat Struct Mol Biol.** v. 13, n. 3, p. 272-277. 2006.

- HOBEIKA, M.; BROCKMANN, C.; IGLESIAS, N.; GWIZDEK, C.; NEUHAUS, D.; STUTZ, F.; STEWART, M.; DIVITA, G.; DARGEMONT, C. Coordination of Hpr1 and ubiquitin binding by the UBA domain of the mRNA export factor Mex67. **Mol Biol Cell**. v. 18, n. 7, p. 2561-2568. 2007.
- HOCHSTRASSER, M. Ubiquitin-dependent protein degradation. **Annual Review of Genetics**. v. 30, p. 405-439. 1996.
- HOCHSTRASSER, M. Evolution and function of ubiquitin-like protein-conjugation systems. **Nat Cell Biol**. v. 2, n. 8, p. E153-157. 2000.
- HOEGE, C.; PFANDER, B.; MOLDOVAN, G. L.; PYROWOLAKIS, G.; JENTSCH, S. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. **Nature**. v. 419, n. 6903, p. 135-41. 2002.
- HOFMANN, K.; BUCHER, P. The UBA domain: a sequence motif present in multiple enzyme classes of the ubiquitination pathway. **Trends Biochem Sci**. v. 21, n. 5, p. 172-173. 1996.
- HOFMANN, R. M; PICKART, C. M. In vitro assembly and recognition of Lys-63 polyubiquitin chains. **J. Biol. Chem**. v. 276, n. 30, p. 27936-27943. 2001.
- HOOK, S. S.; ORIAN, A.; COWLEY, S. M.; EISENMAN, R. N. Histone deacetylase 6 binds polyubiquitin through its zinc finger (PAZ domain) and copurifies with deubiquitinating enzymes. **Proc Natl Acad Sci**. v. 99, n. 21, p. 13425-13430. 2002.
- HOPPE, T. Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all. **Trends in Biochemical Sciences**. v. 30, p. 183-187. 2005.
- HORAK, J.; WOLF, D.H. Glucose-induced monoubiquitination of the *Saccharomyces cerevisiae* galactose transporter is sufficient to signal its internalization. **J Bacteriol**. v. 183, n. 10, p. 3083-8. 2001.
- HUANG, D. T.; PAYDAR, A.; ZHUANG, M.; WADDELL, M. B.; HOLTON, J. M.; SCHULMAN, B. A. Structural basis for recruitment of Ubc12 by an E2 binding domain in NEDD8's E1. **Mol Cell**. v. 17, n. 3, p. 341-350. 2005.
- HUIBREGTSE, J. M.; SCHEFFNER, M.; BEAUDENON, S.; HOWLEY, P. M. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. **Proc Natl Acad Sci**. v. 92, n. 7, p. 2563-2567. 1995.
- IYER, N. G.; CHIN, S. F.; OZDAG, H.; DAIGO, Y.; HU, D. E.; CARIATI, M.; BRINDLE, K.; APARICIO, S.; CALDAS, C. p300 regulates p53-dependent apoptosis after DNA damage in colorectal cancer cells by modulation of PUMA/p21 levels. **Proc Natl Acad Sci**. v. 101, n. 19, p. 7386-7391. 2004.
- JACKSON, P. K.; ELDRIDGE, A. G.; FREED, E.; FURSTENTHAL, L.; HSU, J. Y.; KAISER, B. K.; REIMANN, J. D. The lore of the RINGS: substrate

- recognition and catalysis by ubiquitin ligases. **Trends Cell Biol.** v. 10, n. 10, p. 429-439. 2000.
- JACOBS, A. M.; NICOL, S. M.; HISLOP, R. G.; JAFFRAY, E. G.; HAY, R. T.; FULLER-PACE, F. V. SUMO modification of the DEAD box protein p68 modulates its transcriptional activity and promotes its interaction with HDAC1. **Oncogene.** v. 26, n. 40, p. 5866-5876. 2007.
- JARIEL-ENCONTRE, I.; BOSSIS, G.; PIECHACZYK, M. Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome. **Biochimica et Biophysica Acta.** v. 1786, p. 153-177. 2008.
- JOHNSON, P.J.; KOOTER, J.M.; BORST, P. Inactivation of transcription by UV irradiation of *T. brucei* provides evidence for a multicistronic transcription unit including a VSG gene. **Cell.** v. 51, n. 2, p. 273-281. 1987.
- KELLY, J.M., WARD, H.M., MILES, M.A., KENDALL, G. A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. **Nucleic Acids Research.** v. 20, n. 15, p. 3963-3969. 1992.
- KERSCHER, O.; FELBERBAUM, R.; HOCHSTRASSER, M. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** v. 22, p. 159-180. 2006.
- KIM, J.H., PARK, K.C., CHUNG, S.S., BANG, O., CHUNG, C.H. Deubiquitinating enzymes as cellular regulators. **Journal of biochemistry Special review.** v. 134, n. 1, p. 9-18. 2003.
- KIMBREL, E. A; KUNG, A. L. The F-box Protein β -TrCp1/Fbw1a Interacts with p300 to Enhance β -Catenin Transcriptional Activity. **J Biol Chem.** v. 284, n. 19, p. 13033-13044. 2009.
- KIRCHHOFF, L. V.; KIM, K. S.; ENGMAN, D. M.; DONELSON, J. E. Ubiquitin genes in trypanosomatidae. **J Biol Chem.** v. 263, n. 25, p. 12698-12704. 1988.
- KOEGL, M.; HOPPE, T.; SCHLENKER, S.; ULRICH, H. D.; MAYER, T. U.; JENTSCH, S. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. **Cell.** v. 96, n. 5, p. 635-644. 1999.
- KOSSEN, K.; UHLENBECK, O. C. Cloning and biochemical characterization of *Bacillus subtilis* YxiN, a DEAD protein specifically activated by 23S rRNA: delineation of a novel sub-family of bacterial DEAD proteins. **Nucleic Acids Res.** v. 27, n. 19, p. 3811-3820. 1999.
- KOOTER, J.M.; VAN DER SPEK, H.J.; WAGTER, R.; D'OLIVEIRA, C.E.; VAN DER HOEVEN, F.; JOHNSON, P.J.; BORST, P. The anatomy and transcription of a telomeric expression site for variant-specific surface antigens in *T. brucei*. **Cell.** v. 51, n. 2, p. 261-272. 1987.

- LAKE, M. W.; WUEBBENS, M. M.; RAJAGOPALAN, K. V.; SCHINDELIN, H. Mechanism of ubiquitin activation revealed by the structure of a bacterial MoeB-MoaD complex. **Nature**. v. 414, n. 6861, p. 325-329. 2001.
- LANDY, A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. **Annu. Rev. Biochem.** v. 58, p. 913-949. 1989.
- LARSEN, C. N.; KRANTZ, B. A.; WILKINSON, K. D. Substrate specificity of deubiquitinating enzymes: ubiquitin C-terminal hydrolases. **Biochemistry**. v. 37, n. 10, p. 3358-3368. 1998.
- LEE, I.; SCHINDELIN, H. Structural insights into E1-catalyzed ubiquitin activation and transfer to conjugating enzymes. **Cell**. v. 134, n. 2, p. 268-278. 2008.
- LEE, M.G.; VAN DER PLOEG, L. H. Transcription of protein-coding genes in trypanosomes by RNA polymerase I. **Annu. Rev. Microbiol.** v. 51, p. 463-89. 1997.
- LEE, S.; TSAI, Y. C.; MATTERA, R.; SMITH, W. J.; KOSTELANSKY, M. S.; WEISSMAN, A. M.; BONIFACINO, J. S.; HURLEY, J. H. Structural basis for ubiquitin recognition and autoubiquitination by Rabex-5. **Nat Struct Mol Biol**. v. 13, n. 3, p. 264-271. 2006.
- LEVINGER L.; VARSHAVSKY, A. Selective arrangement of ubiquitinated and DI protein-containing nucleosomes within the Drosophila genome. **Cell**. v. 28, p. 375-385. 1982.
- LOIS, L. M.; LIMA, C. D. Structures of the SUMO E1 provide mechanistic insights into SUMO activation and E2 recruitment to E1. **EMBO J**. v. 24, n. 3, p. 439-451. 2005.
- LORICK KL, JENSEN JP, FANG S, ONG AM, HATAKEYAMA S, WEISSMAN AM. RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 96, n. 20, p. 11364-11369. 1999.
- LOVE, K. R.; CATIC, A.; SCHLIEKER, C.; PLOEGH, H. L. Mechanisms, biology and inhibitors of deubiquitinating enzymes. **Nat Chem Biol**. v. 3, n. 11, p. 697-705. 2007.
- LYAPINA, S.; COPE, G.; SHEVCHENKO, A.; SERINO, G.; TSUGE, T.; ZHOU, C.; WOLF, D. A.; WEI, N.; SHEVCHENKO, A.; DESHAIES, R. J. **Science**. v. 292, n. 5520, p. 1382-1385. 2001.
- MADURA, K. The ubiquitin-associated (UBA) domain: on the path from prudence to prurience. **Cell Cycle**. v. 1, n. 4, p. 235-244. 2002.

- MAKAROVA, K. S.; ARAVIND, L.; KOONIN, E. V. A novel superfamily of predicted cysteine proteases from eukaryotes, viruses and *Chlamydia pneumoniae*. **Trends Biochem Sci.** v. 25, n. 2, p. 50-52. 2000.
- McCULLOUGH, J.; CLAGUE, M. J.; URBÉ, S. AMSH is an endosome-associated ubiquitin isopeptidase. **J Cell Biol.** v. 166, n. 4, p. 487-492. 2004.
- McCUTCHEN-MALONEY, S. L.; MATSUDA, K.; SHIMBARA, N.; BINNS, D. D.; TANAKA, K.; SLAUGHTER, C. A.; DEMARTINO, G. N. cDNA cloning, expression, and functional characterization of PI31, a proline-rich inhibitor of the proteasome. **J. Biol. Chem.** v. 275, p. 18557–18565. 2000.
- MEANS, A. R. The Year in Basic Science: calmodulin kinase cascades. **Mol Endocrinol.** v. 22, n. 12, p. 2759-2765. 2008.
- MEDINA-LOPES MD. **Transmissão materno-infantil da Doença de Chagas.** 1983. 137f. Dissertação - Núcleo de Medicina Tropical e Nutrição, Universidade de Brasília.
- MEYER, H. H.; WANG, Y.; WARREN, G. Direct binding of ubiquitin conjugates by the mammalian p97 adaptor complexes, p47 and Ufd1-Npl4. **EMBO J.** v. 21, n. 21, p. 5645-5652. 2002.
- MILLER, J.; MCLACHLAN, A. D.; KLUG, A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. **EMBO J.** v. 4, n. 6, p. 1609-1614. 1985.
- MIZUNO, E.; KAWAHATA, K.; KATO, M.; KITAMURA, N.; KOMADA, M. STAM proteins bind ubiquitinated proteins on the early endosome via the VHS domain and ubiquitin-interacting motif. **Mol Biol Cell.** v. 14, n. 9, p. 3675-3689. 2003.
- MOGK, A.; SCHMIDT, R.; BUKAU, B. The N-end rule pathway for regulated proteolysis: prokaryotic and eukaryotic strategies. **Trends Cell Biol.** v. 17, n. 4, p. 165-172. 2007.
- MUKHOPADHYAY, D., RIEZMAN, H. Proteasome-Independent Functions of Ubiquitin in Endocytosis and Signaling. **Science.** v. 315, n. 5809, p. 201-205. 2007.
- MULLALLY, J. E.; CHERNOVA, T.; WILKINSON, K. D. Doa1 is a Cdc48 adapter that possesses a novel ubiquitin binding domain. **Mol Cell Biol.** v. 26, n. 3, p. 822-830. 2006.
- MURATANI, M., TANSEY, W.P. How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. **Nature Reviews, Molecular cell biology.** v. 4, n. 3, p. 192-201. 2003.

- NALEPA, G.; ROLFE, M.; HARPER, J. W. Drug discovery in the ubiquitin-proteasome system. **Nat Rev Drug Discov.** v. 5, n. 7, p. 596-613. 2006.
- NANAO, M. H.; TCHERNIUK, S. O.; CHROBOCZEK, J.; DIDEBERG, O.; DESSEN, A.; BALAKIREV, M. Y. Crystal structure of human otubain 2. **EMBO Rep.** v. 5, n. 8, p. 783-788. 2004.
- NIJMAN, S. M.; LUNA-VARGAS, M. P.; VELDS, A.; BRUMMELKAMP, T. R.; DIRAC, A. M.; SIXMA, T. K.; BERNARDS, R. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. **Cell.** v. 123, n. 5, p. 773-786. 2005.
- NISHIOKA, M.; MIZUGUCHI, H.; FUJIWARA, S.; KOMATSUBARA, S.; KITABAYASHI, M.; UEMURA, H.; TAKAGI, M.; IMANAKA, T. Long and accurate PCR with a mixture of KOD DNA polymerase and its exonuclease deficient mutant enzyme. **J Biotechnol.** v. 88, p. 141-149. 2001.
- NUNES, L.R.; CARVALHO, M.R.; SHAKARIAN, A.M.; BUCK, G.A. The transcription promoter of the spliced leader gene from *Trypanosoma cruzi*. **Gene.** v. 2, n. 188, p. 157-168. 1997.
- OHI, M. D.; VANDER KOOI, C. W.; ROSENBERG, J. A.; CHAZIN, W. J.; GOULD, K. L. Structural insights into the U-box, a domain associated with multi-ubiquitination. **Nat Struct Biol.** v. 10, n. 4, p. 250-255. 2003.
- PENG, J. Evaluation of proteomics strategies for analyzing ubiquitinated proteins. **BMB reports.** v. 41, n. 3, p. 177-183. 2008.
- PICKART, C. M. Mechanisms underlying ubiquitination. **Annu. Rev. Microbiol.** v. 70, p. 503-533. 2001.
- PICKART, C.M.; COHEN, R.E. Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. **Nature reviews, Molecular Cell Biology.** v. 5, p. 177-187. 2004.
- PICKART, C. M.; EDDINS, M. J. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. **Biochim Biophys Acta.** v. 1695, n. 1-3, p. 55-72. 2004.
- PICKART, C. M.; ROSE, I. A. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase acts on ubiquitin carboxyl-terminal amides. **J Biol Chem.** v. 260, n. 13, p. 7903-7910. 1985.
- PORNILLOS, O.; ALAM, S. L.; RICH, R. L.; MYSZKA, D. G.; DAVIS, D. R.; SUNDQUIST, W. I. Structure and functional interactions of the Tsg101 UEV domain. **EMBO J.** v. 21, n. 10, p. 2397-2406. 2002.
- PUIG, O.; CASPARY, F.; RIGAUT, G.; RUTZ, B.; BOUVERET, E.; BRAGADONILSSON, E.; WILM, M.; SÉRAPHIN, B. The Tandem Affinity Purification (TAP) Method: A General Procedure of Protein Complex Purification. **Methods.** v. 24, n. 3, p. 218-229. 2002.

- PUIGBÓ, J.J.; ACQUATELLA, H.; GIORDANO, H.; SUÁREZ, C. Analisis de los factores de riesgo em la cardiopatía chagásica crónica. Em: Madoery, R., Madoery, C., Cámara, M. L. (orgs.). **Actualizaciones en la Enfermedad de Chagas**. Buenos Aires: Congreso Nacional de Medicina, 1993. p 57-78.
- RAPPSILBER, J.; ISHIHAMA, Y.; MANN, M. Stop and Go Extraction Tips for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, Nanoelectrospray, and LC/MS Sample Pretreatment in Proteomics. **Anal. Chem.** v. 75, p. 663-670. 2003.
- RASSI, A.; RASSI, J. A.; RASSI, G. G. Fase aguda. Em: Zigman Brenner, Zilton Andrade e Manoel Barral-Neto. **Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p 231-245.
- RECHSTEINER, M.; REALINI, C.; USTRELL, V. The proteasome activator 11 S REG (PA28) and class I antigen presentation. **Biochem. J.** v. 345, p. 1–15. 2000.
- RECHSTEINER, M. e HILL, C. P. Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. **Trends Cell Biol.** v. 15, p. 27–33. 2005.
- REYES-TURCU, F. E.; WILKINSON, K. D. Polyubiquitin binding and disassembly by deubiquitinating enzymes. **Chem Rev.** v. 109, n. 4, p. 1495-1508. 2009.
- RIGAUT, G.; SHEVCHENKO, A.; RUTZ, B.; WILM, M.; MANN, M.; SÉRAPHIN, B. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. **Nature Biotechnology.** v. 17, p. 1030 – 1032. 1999.
- ROBINSON, P. A.; ARDLEY, H. C. Ubiquitin-proteins ligases. **J Cell Sci.** v. 117 (Pt 22), p. 5191-5194. 2004.
- ROHWEDDER, R.W. Infección chagásica en dadores de sangre y las probabilidades de transmitirla por medio de la transfusión. **Bol Chil Parasitol.** v. 24, p. 88-93. 1969.
- ROSE, I. A.; WARMS, J. V. An enzyme with ubiquitin carboxy-terminal esterase activity from reticulocytes. **Biochemistry.** v. 22, n. 18, p. 4234-7. 1983.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual**. N.Y: Cold Spring Harbor, 1989.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci.** v. 74, n. 12, p. 5463–5467. 1977.

- SCHEEL, H.; TOMIUK, S.; HOFMANN, K. Elucidation of ataxin-3 and ataxin-7 function by integrative bioinformatics. **Hum Mol Genet.** v. 12, n. 21, p. 2845-2852. 2003.
- SCHEFFNER, M.; HUIBREGTSE, J. M.; VIERSTRA, R. D.; HOWLEY, P. M. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. **Cell.** v. 75, n. 3, p. 495-505. 1993.
- SCHENONE, H.; IGLESIAS, J.; SCHENONE, S.; CONTRERAS, M. del C. Infección chagásica congénita de segunda generación. **Bol Chil Parasitol.** v. 42, p. 71-73. 1987.
- SCHMIDT, M.; HAAS, W.; CROSAS, B.; SANTAMARIA, P. G.; GYGI, S. P.; WALZ, T.; FINLEY, D. The HEAT repeat protein Blm10 regulates the yeast proteasome by capping the core particle. **Nat. Struct. Mol. Biol.** v. 12, p. 294–303. 2005.
- SCHMUÑIS, G. A. A tripanossomíase americana e seu impacto na saúde pública das américas. Em: Zigman Brener, Zilton Andrade e Manoel Barral-Neto. **Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p 1-15.
- SCHNAUFER, A.; PANIGRAHI, A. K.; PANICUCCI, B.; IGO Jr, R. P.; SALAVATI, R.; STUART, K. An RNA Ligase Essential for RNA Editing and Survival of the Bloodstream Form of *Trypanosoma brucei*. **Science.** v. 291, n. 5511, p. 2159 – 2162. 2001.
- SCHWARTZ, D; CANTOR, C. R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulse field gradient gel electrophoresis. **Cell.** v. 37, p. 67-75. 1984.
- SHAPIRO, T.A.; ENGLUND, P.T. The structure and replication of kinetoplast DNA. **Annu. Rev. Microbiol.** v. 49, p. 117-143. 1995.
- SHARP, P. M.; LI, W. H. Ubiquitin Genes as a Paradigm of Concerted Evolution of Tandem Repeats. **Journal of Molecular Evolution.** v. 25, p. 58-64. 1987.
- SHIBA, Y.; KATOH, Y.; SHIBA, T.; YOSHINO, K.; TAKATSU, H.; KOBAYASHI, H.; SHIN, H. W.; WAKATSUKI, S.; NAKAYAMA, K. GAT (GGA and Tom1) domain responsible for ubiquitin binding and ubiquitination. **J Biol Chem.** v. 279, n. 8, p. 7105-7111. 2004.
- SILVEIRA, J.F. Biologia Molecular do *Trypanosoma cruzi*. Em: Zigman Brener, Zilton Andrade e Manoel Barral-Neto. **Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p 127-152.
- SIMPSON, L.; THIEMANN, O. H.; SAVILL, N. J.; ALFONZO, J. D.; MASLOV, D. A. Evolution of RNA editing in trypanosome mitochondria. **PNAS.** v. 97, n. 13, p. 6986-6993. 2000.

SLAGSVOLD, T.; AASLAND, R.; HIRANO, S.; BACHE, K. G.; RAIBORG, C.; TRAMBAIOLO, D.; WAKATSUKI, S.; STENMARK, H. Eap45 in mammalian ESCRT-II binds ubiquitin via a phosphoinositide-interacting GLUE domain. **J Biol Chem.** v. 280, n. 20, p. 19600-19606. 2005.

STEVERDING, D. Ubiquitination of plasma membrane ectophosphatase in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. **Parasitol Res.** v. 98, n. 2, p. 157-161. 2006.

SWINDLE, J.; AJIOKA, J.; EISEN, H.; SANWAL, B.; JACQUEMOT, C.; BROWDER, Z.; BUCK, G. The genomic organization and transcription of the ubiquitin genes of *Trypanosoma cruzi*. **EMBO J.** v. 7, n. 4, p. 1121-1127. 1988.

TAKAGI, M.; NISHIOKA, M.; KAKIHARA, H.; KITABAYASHI, M.; INOUE, H.; KAWAKAMI, B.; OKA, M.; IMANAKA, T. Characterization of DNA polymerase from *Pyrococcus* sp. Strain KOD1 and its application to PCR. **Appl Environ Microbiol.** v.63, p. 4504–4510. 1997.

TEIXEIRA, S. M. R. Control of gene expression in Trypanosomatidae. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 31, n. 12, p. 1503-1516. 1998.

TEIXEIRA, S. M. R.; daROCHA, W. Controlo f gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. **Genetics and Molecular Research.** v. 2, n. 1, p. 148-158. 2003.

TELLES, S.; ABATE, T.; SLEZYNGER, T. C.; HENRÍQUEZ, D. A. *Trypanosoma cruzi* and human ubiquitin are immunologically distinct proteins despite only three amino acid difference in their primary sequence. **FEMS Immunol Med Microbiol.** v. 24, n. 2, p. 123-130. 1999.

TELLES, S.; ABATE, T.; SLEZYNGER, T. C.; HENRÍQUEZ, D. A. *Trypanosoma cruzi* ubiquitin as an antigen in the differential diagnosis of Chagas disease and leishmaniasis. **FEMS Immunol Med Microbiol.** v. 37, n. 1, p. 23-28. 2003.

THROWER, J.S; HOFFFMAN, L.; RECHSTEINER,M.; PICKART, C.M. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. **Embo Journal.** v. 19, p. 94-102. 2000.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON,J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the.** v. 76, p. 4350-4. 1979.

TYLER, K. M; ENGMAN, D. M . The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **Int J Parasitol.** v. 31, p. 472-481. 2001.

ULLU, E.; TSCHUDI,C. Accurate modification of the trypanosome spliced leader cap structure in a homologous cell-free system. **J. Biol. Chem.** v. 270, n. 35, p. 20365-20369. 1995.

USTRELL, V.; HOFFMAN, L.; PRATT, G.; RECHSTEINER, M. PA200, a nuclear pro-teasome activator involved in DNA repair. **EMBO J.** v. 21, p. 3516–3525. 2002.

VANHAMME, L.; PAYS, E. Control of Gene Expression in Trypanosomes. **Microbiol. Rev.** v. 59, n. 2, p. 223-240. 1995.

VASILESCU, J.; SMITH, J.C.; ETHIER, M.; FIGEYS, D. Proteomic Analysis of Ubiquitinated Proteins from Human MCF-7 Breast Cancer Cells by Immunoaffinity Purification and Mass Spectrometry. **Journal of Proteome Research.** v. 4, p. 2192-2200. 2005.

VERMA, R.; ARAVIND, L.; OANIA, R.; MCDONALD, W. H.; YATES, J. R. 3RD; KOONIN, E. V.; DESHAIES, R. J. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. **Science.** v. 298, n. 5593, p. 611-615. 2002.

VICKERMAN, K.; TETLEY, L. Recent structural studies on trypanosomes. **Annals Society Belgian Medicine Tropical.** v. 57, n. 4-5, p. 441-457. 1977.

VIJAY-KUMAR, S.; BUGG, C. E.; COOK, W. J. Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. **J Mol Biol.** v. 194, n. 3, p. 531-44. 1987.

WALDEN, H.; PODGORSKI, M. S.; HUANG, D. T.; MILLER, D. W.; HOWARD, R. J.; MINOR, D. L. JR; HOLTON, J. M.; SCHULMAN, B. A. The structure of the APPBP1-UBA3-NEDD8-ATP complex reveals the basis for selective ubiquitin-like protein activation by an E1. **Mol Cell.** v. 12, n. 6, p 1427-1437. 2003.

WANG, C.; XI, J.; BEGLEY, T. P.; NICHOLSON, L. K. Solution structure of ThiS and implications for the evolutionary roots of ubiquitin. **Nat Struct Biol.** v. 8, n. 1, p. 47-51. 2001.

WEISSMAN, A. M. Themes and variations on ubiquitylation. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology.** v. 2, p. 169-178. 2001.

WELCHMAN, R. L.; GORDON, C.; MAYER, J. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology.** v. 6, p. 599-608. 2005.

WERTZ, I. E.; O'ROURKE, K. M.; ZHOU, H.; EBY, M.; ARAVIND, L.; SESHAGIRI, S.; WU, P.; WIESMANN, C.; BAKER, R.; BOONE, D. L.; MA, A.; KOONIN, E. V.; DIXIT, V. M. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. **Nature.** v. 430, n. 7000, p. 694-699. 2004.

WILKINSON, K. D.; URBAN, M. K. HAAS, A.L. Ubiquitin is the ATP-dependent proteolytic factor of rabbit reticulocytes. **J. Biol. Chem.** v. 255, p. 7529-7532. 1980.

WINBORN, B. J.; TRAVIS, S. M.; TODI, S. V.; SCAGLIONE, K. M.; XU, P.; WILLIAMS, A. J.; COHEN, R. E.; PENG, J.; PAULSON, H. L. The deubiquitinating enzyme ataxin-3, a polyglutamine disease protein, edits Lys63 linkages in mixed linkage ubiquitin chains. **J Biol Chem.** v. 283, n. 39, p. 26436-26443. 2008.

WHITBY, F. G.; XIA, G.; PICKART, C. M.; HILL, C. P. Crystal structure of the human ubiquitin-like protein NEDD8 and interactions with ubiquitin pathway enzymes. **J Biol Chem.** v. 273, n. 52, p. 34983-34991. 1998.

WOELK, T.; OLDRINI, B.; MASPERO, E.; CONFALONIERI, S.; CAVALLARO, E.; DI FIORE, P. P.; POLO, S. Molecular mechanisms of coupled monoubiquitination. **Nat Cell Biol.** v. 8, n. 11, p. 1246-54. 2006.

WOELK, T.; SIGISMUND, S.; PENENGO, L.; POLO, S. The ubiquitination code: a signalling problem. **Cell Division.** v. 2, p. 11. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION.. WHO Consultation on International Biological Reference Preparations for Chagas Diagnostic Tests. Geneva: 2007.

YAO, T.; COHEN, R. E. A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. **Nature.** v. 419, n. 6905, p. 403-407. 2002.

YOUNG, P.; DEVERAUX, Q.; BEAL, R. E.; PICKART, C. M.; RECHSTEINER, M. Characterization of two polyubiquitin binding sites in the 26 S protease subunit 5a. **J Biol Chem.** v. 273, n. 10, p. 5461-5467. 1998.